

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



\* 5 3 0 9 6 5 5 8 6 X \*  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

EFECTO DE LA CARENCIA DE YODO Y/O HORMONAS  
TIROIDEAS, DURANTE EL PERIODO FETAL Y  
NEONATAL, EN LA MADURACION DE LA GLIA RADIAL,  
FORMACION DE CAPAS CORTICALES Y MIELINIZACION  
DEL CEREBRO DE LA RATA.

JUAN RAMON MARTINEZ GALAN

INSTITUTO CAJAL

1996

21.161

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

**EFFECTO DE LA CARENCIA DE YODO Y/O HORMONAS TIROIDEAS, DURANTE  
EL PERIODO FETAL Y NEONATAL, EN LA MADURACION DE LA GLIA  
RADIAL, FORMACION DE CAPAS CORTICALES Y MIELINIZACION DEL  
CEREBRO DE LA RATA**

D. Antonio Ruiz Marcos y Dña. María Santacana Altimiras, Profesor de Investigación y Colaborador Científico, respectivamente, del Instituto Cajal del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

**CERTIFICAN:**

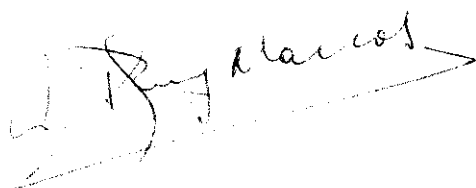
Que el licenciado D. Juan Ramón Martínez Galán ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos experimentales que han conducido a la elaboración de esta Tesis Doctoral. Consideramos que tanto el contenido científico como la presentación de esta memoria reúnen las condiciones necesarias para su defensa.

Y para que conste ante quien proceda, firmamos el presente en Madrid, a 23 de Julio de mil novecientos noventa y seis

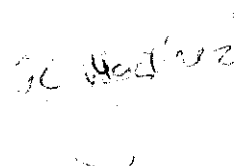
Los directores de la Tesis

Fdo: Antonio Ruiz Marcos

María Santacana Altimiras



Tesis Doctoral presentada por:  
Juan Ramón Martínez Galán



Especialmente dedicado a mi mujer, Mónica, por el apoyo y la confianza que siempre he recibido.

A mi familia por su comprensión y cariño.

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han colaborado en la realización de este trabajo y que con su ayuda han hecho posible que esta Tesis Doctoral se haya podido llevar a cabo.

A mis directores de tesis, el Prof. Antonio Ruiz Marcos y la Dra. María Santacana, por haber puesto en mis manos todos los medios necesarios, tanto técnicos como humanos, para poder realizar este trabajo.

A Taty Fernandez de Molina, por su constante y eficaz ayuda durante estos años

A los Profs. Francisco Escobar y Gabriela Morreale de Escobar, por su inestimable apoyo y colaboración en esta tesis. A Pablo Pedraza, María Socorro Durán y M<sup>a</sup> Jesús Presas, por la realización de las dietas pobre en yodo, RIAs y cuidado de los animales en el Instituto de Investigaciones Biomédicas.

A la Dra. Margarita Heredia por su colaboración y sus acertadas críticas durante la elaboración de este trabajo

A todo el equipo del Prof. Facundo Valverde, a M<sup>a</sup> Luisa Poves, a la Dra. Laura López, y al Dr. Juan de Carlos, por su ayuda desinteresada.

A los amigos del Cajal, en particular a Alberto, Jose Luis, Angel, Charo, Pilar, Begoña, Marimar, etc., por los buenos momentos que hemos pasado juntos. También a todo el personal del Instituto que de un modo u otro me hayan podido facilitar la estancia en el Centro.



1. INTRODUCCION.....	1
1.1. Hormonas tiroideas, síntesis, estructura y función.....	1
1.2. Situaciones patológicas de carencia de hormonas tiroideas y modelos experimentales.....	4
1.3. Hormonas tiroideas en el desarrollo del sistema nervioso central.....	8
1.3.1. Tipos de receptores tiroideos en cerebro.....	8
1.3.2. Alteraciones neuronales histológicas y moleculares en ratas hipotiroideas.....	9
1.4. Glía radial y migración neuronal.....	11
1.4.1. Formación de capas en corteza cerebral y factores que la afectan.....	11
1.4.2. Génesis del hipocampo y disposición de la glía radial.....	14
1.4.3. Efecto de hormonas tiroideas sobre la astroglia.....	15
1.5. Efectos de déficit tiroideos en mielinización.....	16
1.5.1. Influencia de la triyodotironina en oligodendroglía.....	16
2. OBJETIVOS.....	18
3. MATERIAL Y METODOS.....	20
3.1. Animales de experimentación.....	20
3.2. Control del hipotiroidismo.....	22
3.3. Inmunohistoquímica.....	22
3.3.1. Marcaje de mielina en estriado utilizando anticuerpos monoclonales contra MBP.....	23
3.3.2. Identificación de procesos de glía radial “madura” en hipocampo y corteza cerebral mediante el uso de anticuerpos policlonales para GFAP.....	24
3.3.3. Identificación de procesos de glía radial “inmadura” en hipocampo y corteza cerebral utilizando anticuerpos monoclonales contra nestina.....	25
3.4. Autorradiografía.....	25
3.4.1. Perfusión, inclusión en parafina, obtención de cortes y montaje de los mismos.....	26
3.4.2. Impregnación de los portas en la emulsión fotográfica.....	27
3.4.3. Revelado.....	27
3.4.4. Tinción Nissl.....	27
3.5. Métodos de cuantificación y análisis estadísticos.....	28
3.5.1. Cuantificación de glía radial en corteza cerebral e hipocampo.....	28
3.5.2. Densidad superficial de procesos mielinizados.....	28
3.5.3. Estimación del número de neuronas marcadas radiactivamente.....	29
3.5.4. Análisis estadísticos de los datos.....	31
4. RESULTADOS.....	33
4.1. Control del hipotiroidismo.....	33
4.1.1. Pesos.....	33
4.1.2. Determinaciones hormonales.....	34
4.1.2.1. Niveles de HT en suero de ratas hembras adultas C y MMI.....	34
4.1.2.2. Niveles de HT en cerebro de fetos C, LI, L, LP y MMI en E-21.....	36
4.1.2.3. Niveles de HT en cerebro de ratas C, LI, LP y MMI desde E-21 a P-32.....	37

4.2. Comparaciones morfológicas entre grupos controles (C, LI).....	43
4.3. Número de procesos de glía radial (fibras nestina o GFAP positivas) en edad fetal en el hipocampo de ratas controles (C, LI) e hipotiroideas (L, LP, MMI)...	43
4.4. Número de procesos de glía radial (fibras nestina o GFAP positivas) en edad fetal y neonatal en la corteza cerebral de ratas controles (C, LI) e hipotiroideas (L, LP, MMI).....	44
4.5. Efectos de la carencia de yodo en la neurogénesis en corteza cerebral. Formación de capas corticales en el área visual de ratas controles (LI) e hipotiroideas (LP).....	58
4.6. Densidad superficial de procesos MBP marcados en el estriado de ratas controles (C, LI) e hipotiroideas (LP, MMI).....	70
4.6.1. Densidad superficial de procesos mielinizados en estriado total.....	70
4.6.2. Densidad superficial de procesos mielinizados en estriado lateral y medial.....	80
4.6.3. Densidad superficial de procesos mielinizados en estriado DL, VL, VM y DM.....	85
5. DISCUSION.....	88
5.1. Modelos experimentales de hipotiroidismo.....	88
5.1.1. Pesos y niveles hormonales de ratas C y MMI.....	89
5.1.2. Pesos y niveles hormonales de ratas LI, L y LP.....	90
5.2. Estudio de la glía radial en edad fetal en el hipocampo de ratas controles (C, LI) e hipotiroideas (L, LP, MMI).....	92
5.3. Evolución de la glía radial en edad fetal y neonatal en la corteza cerebral de ratas controles (C, LI) e hipotiroideas (L, LP y MMI).....	94
5.4. Estudio de la formación de capas corticales en el área visual de ratas controles (LI) e hipotiroideas (LP).....	98
5.5. Desarrollo de la mielinización en el estriado de ratas controles (C, LI) e hipotiroideas (LP, MMI).....	102
6. CONCLUSIONES.....	107
7. BIBLIOGRAFIA.....	109

## **ABREVIATURAS**

DL: dorsolateral

DM: dorsomedial

DPY: dietas pobres en yodo

GFAP: proteína fibrilar ácida de glía

HT: hormonas tiroideas

L: ratas mantenidas a DPY

LI: ratas mantenidas a DPY + yoduro potásico

LP: ratas mantenidas a DPY + perclorato potásico

MAG: glicoproteína asociada a mielina

MBP: proteína básica de mielina

MMI: mercaptometilimidazol

PB: tampón fosfato

PBS: tampón fosfato salino

PLP: proteína proteolípica

PTU: propiltiouracilo

RIA: radioinmunoensayo

SNC: sistema nervioso central

T3: 3, 5, 3' triyodotironina

T4: tiroxina

TRE: elemento de respuesta a hormonas tiroideas

VL: ventrolateral

VM: ventromedial

Nota aclaratoria sobre las abreviaturas L, LI y LP:

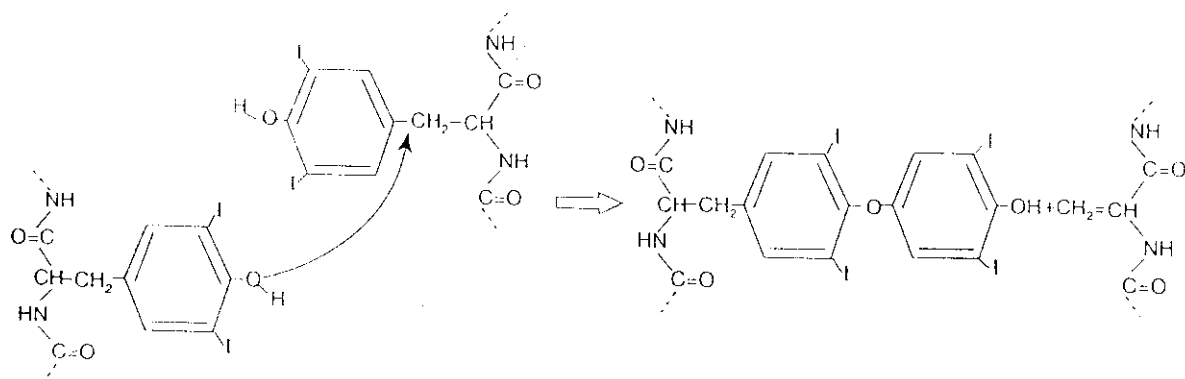
Los nombres con los que han sido denominados estos tres grupos experimentales, comienzan por L debido a que en las presentaciones y trabajos a que ha dado lugar esta tesis se ha seguido la nomenclatura inglesa de acuerdo con la cual a las DPY se las denomina como *low iodine diets* (L), siguiendo la misma regla las siglas LI y LP.

# **1. INTRODUCCION**

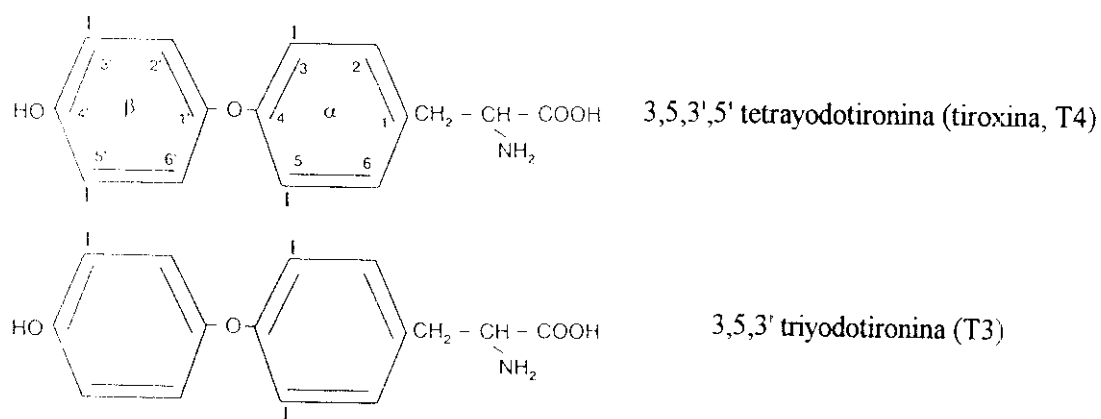
## **1.1. Hormonas tiroideas, síntesis, estructura y función**

Para intentar abordar la influencia que las hormonas tiroideas (HT) tienen en ciertos procesos que suceden durante el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) es importante conocer antes su biosíntesis, así como su estructura. La biosíntesis de HT tiene lugar en el folículo tiroideo, aunque no es posible descartar la síntesis de HT en otros tejidos. El yoduro es captado en el tirocito e incorporado en forma oxidada a una glicoproteína llamada tiroglobulina que se halla en el lumen folicular y que constituye el componente mayoritario del coloide. Esta proteína contiene residuos tirosílicos, algunos de ellos yodados e incorporados por enlace peptídico en la cadena primaria de la tiroglobulina. La reacción de acoplamiento de dos residuos yodados dará lugar a la formación de una u otra hormona tiroidea (figuras 1 y 2).

La estructura de las HT (figura 2) consta de dos anillos bencénicos unidos por un puente de oxígeno, uno de los cuales tiene una cadena de alanina y el otro un grupo fenilo, esta disposición es la de un aminoácido aromático, la tironina. Los carbonos del anillo interno se numeran del 1 al 6 empezando por el carbono de unión a la alanina y los del anillo externo del 1' al 6' empezando por el del puente de oxígeno. La tironina tetrayodada es la 3, 5, 3', 5' tetrayodotironina o tiroxina (T4), producto mayoritario de la secreción tiroidea y que podríamos considerar como una prohormona, ya que de su desyodación en el anillo externo procede la 3, 5, 3' triyodotironina (T3), formada tanto en la glándula como en tejidos extratiroideos y es ésta la que tiene capacidad de interaccionar con los receptores nucleares. Aunque no se excluye un mecanismo de acción extranuclear de HT, gran parte de la actividad de éstas está mediada por la unión de T3 a receptores nucleares específicos de la misma superfamilia que los receptores de esteroides, vitamina D y ácido retinoico (para revisión ver Evans, 1988), estos receptores



**Fig. 1.** Esquema de la reacción de acoplamiento de dos residuos diyodotirosílicos, por la que se formaría la estructura bifenílica de la tetrayodotironina (T4), incorporada por enlace peptídico dentro de la tiroglobulina. La reacción de acoplamiento de un residuo diyodotirosílico y uno monoyodotirosílico daría lugar a un residuo de triyodotironina.



**Fig. 2.** Química y nomenclatura de la triyodotironina (T3) y de la tetrayodotironina (T4).

son factores de transcripción dependientes de ligando que interaccionan con el DNA regulando la expresión de genes específicos (Oppenheimer, 1979; Samuels y col., 1988). De esta forma la actividad hormonal no sólo se regula de forma central para todo el organismo por medio de la TRH (hormona liberadora de tirotropina) y de la TSH (tirotropina), siendo el RNAm de esta última regulado de forma negativa en la adenohipófisis por HT (Franklyn y col., 1986; Mirell y col., 1987), sino que cada tejido puede regularla dependiendo de la necesidad y disponibilidad de hormonas en cada momento mediante la desyodación de T4 por parte de las enzimas desyodasas presentes en los distintos tejidos. Se conocen hasta el momento 3 enzimas capaces de catalizar desyodaciones de HT. La primera es la desyodasa tipo I, una selenoenzima (Behne y col., 1990) que puede actuar en el anillo interno y externo. Se le atribuye la generación en el hígado de la mayor parte de la T3 circulante. La segunda es la desyodasa de tipo II que actúa sobre el anillo externo, muy importante en cerebro para controlar las variaciones de HT que ocurren en periodos críticos del desarrollo, y la tercera es la desyodasa de tipo III que actúa sólo en el anillo interno y está presente en SNC y placenta.

Los efectos de las HT se extienden prácticamente a todos los tejidos, éstos son diferentes dependiendo de la especie animal, el grado de desarrollo, el tipo de tejido, etc. Como sería imposible entrar a describir todos estos efectos voy a citar tres de los más destacados. Uno de los efectos es el de producir numerosos cambios metabólicos, otro su influencia sobre el crecimiento y un tercero la intervención de forma importante en procesos de desarrollo y diferenciación.

Respecto a su papel en el metabolismo, las HT pueden aumentar el metabolismo basal hasta un 60 % o 100 % cuando la secreción de éstas es elevada. Se acelera en forma considerable la transformación de alimentos en energía. La síntesis de proteínas aumenta a veces, mientras que otras veces lo que aumenta es el catabolismo proteínico. Como consecuencia probablemente de la regulación en la síntesis de proteínas, existe un aumento sobre los sistemas enzimáticos celulares (en un plazo aproximado de una semana después de administrar HT por lo menos un centenar de enzimas celulares incrementan en número), por ejemplo, las enzimas oxidativas y los elementos del sistema de transporte

de electrones existentes en la mitocondria. Este incremento global de enzimas origina posiblemente un aumento en el metabolismo de carbohidratos (captación de glucosa, glucolisis y gluconeogénesis) y de lípidos (oxidación de ácidos grasos libres por parte de las células). Aumenta el tamaño, número, superficie total y actividad de las mitocondrias con lo que se acelera la producción de ATP para suministrar energía a las funciones celulares. Este aumento en número y actividad de las mitocondrias quizás pudiera ser el resultado de una mayor actividad celular. Otro enzima que aumenta su nivel en respuesta a las HT es la Na-K-ATPasa (Ismail y Edelman, 1971). Esta enzima aumenta el transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  a través de las membranas celulares de algunos tejidos con lo que se utiliza energía y aumenta la cantidad de calor producida en el organismo.

El segundo de los efectos importantes que hemos citado es su influencia en el crecimiento mediante la regulación positiva en la adenohipófisis por parte de  $\text{T}_3$  del RNAm de la GH (hormona del crecimiento) (Seo y col., 1979; Mirell y col., 1987). Esta es la causa como veremos en el capítulo siguiente de que el enanismo no sea una de las manifestaciones clínicas del cretinismo neurológico, ya que el tiroides de estos individuos sintetiza la cantidad suficiente de  $\text{T}_3$  circulante en sangre como para mantener unos niveles adecuados de GH en el organismo.

El tercer efecto de las HT que hemos citado, aquel que tiene lugar sobre el desarrollo y diferenciación, especialmente en el cerebro, será donde fijemos casi toda nuestra atención de ahora en adelante.

## **1.2. Situaciones patológicas de carencia de hormonas tiroideas y modelos experimentales**

Existen tres manifestaciones clínicas principales en las cuales hay asociados un déficit de HT y retraso mental: cretinismo endémico, relacionado desde el siglo XVIII con



el nacimiento de habitantes sordomudos y deficientes mentales, conocidos como cretinos (Koenig y col., 1981); hipotiroidismo congénito asociado con retraso mental severo desde que Curling describiera dos casos en la segunda mitad del XIX (Klein, 1980); e hipotiroxinemia materna, con o sin hipotiroidismo clínico asociado (Man y col., 1976). El cretinismo endémico se produce en zonas donde hay una carencia de yodo en los alimentos; al faltar en la dieta el aporte necesario de yodo, el tiroides de estos individuos no puede sintetizar los niveles adecuados de HT. En el hipotiroidismo congénito existe una alteración del tiroides, aunque en edad fetal la madre puede proteger al feto con su T4 por lo que las alteraciones neurológicas pueden ser algo menores. Por último, en el caso de la hipotiroxinemia materna es la madre la que tiene un mal funcionamiento de la glándula; en este caso para detectar si existe daño cerebral deberíamos recurrir a tests que midan rendimiento intelectual.

Dentro del cretinismo endémico habría que considerar dos tipos: cretinos neurológicos, individuos a los cuales les funciona bien su tiroides pero les falta el aporte de yodo en la dieta, y aquellos cretinos llamados mixedematosos en los que además de ingerir poco yodo y por razones desconocidas hay una destrucción progresiva de la glándula. Es importante mencionar que no todos los habitantes de zonas deficientes en yodo desarrollan cretinismo neurológico (Delange, 1989). No sabemos exactamente la etiología del daño cerebral en el caso del cretinismo endémico, pero aunque no podamos comprender aún los mecanismos subyacentes si podemos prevenir las causas y por tanto sus consecuencias. A pesar de ello, la deficiencia de yodo es un factor de riesgo para el crecimiento y desarrollo de la población, estimándose que unos 800 millones de personas viven en zonas de carencia de yodo y son susceptibles de padecer bocio endémico (Hetzel, 1983). Para prevenir el nacimiento de cretinos neurológicos bastaría simplemente la administración de aceite o sal yodada a la madre antes o en periodos muy tempranos de la gestación y para evitar el retraso mental de hipotiroideos congénitos se les puede suministrar T4 a partir del nacimiento, aunque puede quedar un daño cerebral mínimo en ambos casos (Morreale de Escobar y col., 1982; Fierro-Benitez 1986; Hebert y col., 1986).

Centrándonos en la patología del cretinismo neurológico y del hipotiroidismo congénito, los primeros muestran defectos importantes en la audición y en el habla: sordomudez; en el aparato locomotor: movimientos espásticos y parálisis; y en la capacidad intelectual. El sistema límbico parece preservarse aunque se han encontrado casos severos con trastornos importantes similares al autismo (De Long, 1989). Los cretinos neurológicos no presentan enanismo ya que su tiroides en respuesta a la falta de yodo en vez sintetizar T4 como HT mayoritaria, sintetiza más cantidad de T3 que requiere un átomo menos de yodo. Esta manera de economizar el escaso yodo disponible hace que la cantidad de T3 que tienen los cretinos neurológicos en sangre sea capaz de regular de forma normal los niveles de GH en la adenohipófisis. Respecto a los hipotiroideos congénitos, éstos son retrasados mentales, pero no presentan disfunciones auditivas ni motoras. Esto es debido, como se dijo anteriormente, a que la T4 de la madre es normal y puede proteger al feto hasta el momento del nacimiento por lo que los daños cerebrales serían menores y no afectarían a la etapa de formación de la cóclea ni a la de génesis y migración neuronal que tienen lugar desde la semana de gestación 10 a la 18 y de la 14 a la 18 respectivamente.

Para estudiar estos efectos el modelo más utilizado hasta ahora ha sido la rata. Una aproximación que se puede hacer para comparar el desarrollo del cerebro en fetos humanos y de rata es que el feto de la rata en edad embrionaria 16-19 días equivale a 12 semanas (3 meses) en el feto humano (Morreale de Escobar y Escobar del Rey, 1983), y la rata recién nacida es comparable al feto humano durante el segundo trimestre de gestación (Dussault y Ruel, 1987). Para correlacionar algunas de las anomalías del cretinismo neurológico encontrados en el hombre con daños hallados en la rata podemos decir que en el déficit auditivo se ve implicado entre otros el oído interno, pudiéndose reproducir estos defectos audiogénicos en ratas sometidas a dietas pobres en yodo (DPY) (Van Middlesworth, 1977), en la disfunción motora podrían estar implicados en el hombre los ganglios basales, es sabido que hay una disminución en la expresión del gen neuronal RC3 en el estriado de ratas (Muñoz y col., 1991) y cabras (Piosik y col., 1995) hipotiroideas. En lo que concierne a la disminución de la capacidad intelectual de los cretinos neurológicos varias áreas de la corteza cerebral estarían afectadas y desde los

trabajos pioneros de Eayrs en 1951 ya hay efectos descritos en ratas hipotiroideas (Eayrs y col., 1951; Eayrs, 1955). Por último para correlacionar algunos de los casos severos de cretinismo neurológico que afectan al sistema límbico se han encontrado en el hipocampo de ratas hipotiroideas algunos cambios morfológicos (Rabie y col., 1979).

Entre los métodos que existen en la actualidad para producir hipotiroidismo en la rata tenemos la utilización de antitiroideos de síntesis: propiltiouracilo (PTU) y mercaptometilimidazol (MMI), administración de ciertos iones (p.e. perclorato), tiroidectomía quirúrgica en edad neonatal temprana, utilización de DPY e incluso la combinación de varios de estos métodos (Middlesworth y Norris, 1980; Morreale de Escobar y col., 1985; Farsetti y col., 1991). El modo de actuación de los primeros es bloquear la oxidación de los iones yoduro, para su posterior incorporación a la tiroglobulina en la glándula tiroides. De ambas drogas es mejor utilizar MMI ya que el PTU tiene el inconveniente de inhibir además la enzima desyodasa tipo I en hígado, lo que impediría la desyodación de T4 en este órgano causando un aumento de T4 en sangre, con lo que esta T4 sí podría ser utilizada por la desyodasa tipo II en cerebro (que no es inhibida por PTU), y permitiría a la rata mantener unos niveles adecuados de T3 en el cerebro. Respecto a la acción de los iones se sabe que interfieren en el tirocito en la captación de iones  $I^-$ . La tiroidectomía quirúrgica no sería útil si lo que queremos valorar son hechos acontecidos durante el periodo de gestación. Por último las DPY sí provocan cambios parecidos a los producidos en zonas de bocio endémico (Abrams y col., 1973; Riesco y col., 1977; Santiesteban y col., 1982). Nosotros hemos utilizado tratamiento con MMI durante toda la gestación y DPY combinadas con perclorato (ver material y métodos) para estudiar el efecto que producen ambos modelos experimentales en procesos de mielinización y migración neuronal en estructuras implicadas en la patología del cretinismo neurológico tales como estriado, hipocampo y corteza cerebral.

### **1.3. Hormonas tiroideas en el desarrollo del sistema nervioso central**

#### **1.3.1. Tipos de receptores tiroideos en cerebro**

Se ha demostrado la existencia de receptores de T3 en el cerebro (Schwartz y Oppenheimer, 1978) lo que indica que parte de los efectos observados en el SNC por HT pueden ser debidos a la unión de T3 con sus receptores en la célula diana, aunque sin poderse descartar los efectos indirectos que se derivan de la activación o inactivación de ciertos genes. La mayor concentración de receptor en el feto humano tiene lugar en la semana 16 (Bernal y Pekonen; 1984) lo que coincide temporalmente con el periodo de multiplicación de neuroblastos. Estos receptores como hemos dicho anteriormente pertenecen a una superfamilia de receptores nucleares y están codificados por dos genes: alfa y beta c-erbA (Weinberger y col., 1986); en la rata esos genes dan lugar a tres receptores funcionales: alfa-1, beta-1 y beta-2 y a otra proteína (alfa-2) que no es capaz de unir T3 (Thompson y col., 1987; Izumo y Madavi, 1988; Lazar y col., 1988). La función de c-erbA-alfa-2 es todavía desconocida, pero se ha demostrado en cultivos que alfa-2 puede inhibir la expresión génica inducida por la unión de T3 a los receptores de tipo alfa-1, beta-1 y beta-2 (Koenig y col., 1989). Por estudios de hibridación *in situ* en cerebros fetales de rata se ha visto que los receptores de tipo alfa-1 y las proteínas alfa-2 son muy numerosos en la placa cortical, en las áreas CA1 y CA3 de hipocampo y en el caudado putamen (entre otros sitios), mientras que los de tipo beta-1 están presentes pero en menor cantidad en la zona ventricular, CA1 y caudado putamen. Los receptores tipo beta-2 parecen estar muy restringidos a la adenohipófisis (Bradley y col., 1992). En el periodo postnatal los receptores de tipo alfa-1 y beta-1 también se hallan presentes en corteza cerebral, hipocampo y estriado lo que podría indicar que ambos receptores son necesarios para funciones específicas y/o complementarias (Mellström y col., 1991). Las proteínas alfa-2 son muy abundantes también en el periodo postnatal pero su papel en el desarrollo del SNC sigue siendo aún confuso. Trabajos posteriores utilizando inmunocitoquímica han demostrado que la distribución del receptor tipo beta-2 es más

amplia expresándose éste en zonas tales como corteza cerebral, hipocampo, cerebelo, etc. (Lechan y col., 1993) lo que aumenta la complejidad para interpretar que papel específico tiene cada receptor en el cerebro.

Tampoco resulta fácil aún elucidar como responden a HT cada una de las distintas poblaciones celulares en el cerebro y que tipo de receptores tiroideos tienen. El receptor tiroideo reconoce una secuencia específica del DNA en los genes sensibles a HT denominada TRE (*thyroid hormone response element*), el núcleo neuronal contiene más de 5000 TRE mientras que el núcleo del astrocito tiene poco menos de 200 TRE (Kolodny, 1985a y 1985b). Experimentos *in vivo* utilizando métodos inmunohistoquímicos han mostrado un marcaje de los cuatro tipos de receptores en oligodendrocitos, ausencia de marcaje para astrocitos y una especificidad alfa-2 para las células grano en el cerebelo y beta-1 para las células de Purkinje (Strait y col., 1991; Carlson y col., 1994), mientras que empleando técnicas inmunocitoquímicas en cultivos celulares se ha visto la presencia de receptores beta-1 en neuronas y alfa-2 en astrocitos (Leonard y col., 1994) sugiriendo este último autor que el marcaje alfa-2 de células grano visto por Strait puede corresponder en realidad a astrocitos. Es posible que los resultados contradictorios se deban al empleo de tejido fijado en un caso y cultivos celulares en otro, ya que proteínas expresadas y marcadas *in vivo* pueden no ser sintetizadas ni localizadas *in vitro*, y viceversa.

### **1.3.2. Alteraciones neuronales histológicas y moleculares en ratas hipotiroideas**

Es sabido que el hipotiroidismo, inducido mediante tiroidectomía quirúrgica, practicada en la rata en edad neonatal afecta el desarrollo de la conectividad sináptica en la corteza cerebral de la rata (Eayrs, 1966 y 1968). Posteriormente se encontró que el hipotiroidismo producido en la rata tanto en edad neonatal (Ruiz-Marcos y col., 1979) como adulta (Ruiz-Marcos y col., 1980, 1982 y 1994), producía una

disminución y redistribución de espinas dendríticas a lo largo de los tallos apicales de las neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza cerebral, así como una reducción en su arborización dendrítica (Ipiña y Ruiz-Marcos, 1986; Ruiz-Marcos e Ipiña, 1986; Ruiz-Marcos, 1988). Estos autores mostraban que si a las ratas tiroidectomizadas a los 10 días de edad postnatal se les suministraba T4 a una dosis de 1.5  $\mu\text{g}$  /100 g de peso desde los 12 a los 60 días de edad postnatal se obtenía una recuperación casi completa del número y distribución de espinas. Si el tratamiento con T4 empezaba 5 días después de la tiroidectomía la recuperación era mucho menor, y si este tratamiento empezaba 30 días después de practicada la tiroidectomía la recuperación era prácticamente nula (Ruiz-Marcos y col., 1982; Ipiña y col., 1987). En el caso de la tiroidectomía practicada en edad adulta (40 y 120 días) el tratamiento podía revertir la pérdida de espinas dendríticas aunque éste comenzara 30 días después de tiroidectomizar la rata (Ruiz-Marcos y col., 1980 y 1994). Esta recuperación a su vez era mayor cuando la dosis de T4 era de 1.75  $\mu\text{g}$  /100 g que cuando tan sólo se aplicaban 1.5  $\mu\text{g}$  /100 g de peso (Ruiz-Marcos y col., 1994).

En el hipocampo un tratamiento neonatal con T4 en ratas normales produce un aumento en el número de células grano del giro dentado (Ramie y col., 1986) y por tanto un incremento en el número de axones (Lauder y Mugniani, 1980) que van a inervar las neuronas piramidales de CA3, lo que origina un aumento del tamaño celular y de la complejidad del árbol dendrítico en éstas neuronas. Consecuencia de ello es un incremento en la densidad de espinas dendríticas en las neuronas piramidales de CA1 que son inervadas vía colaterales de Schaffer por las neuronas de CA3 (Gould y col., 1990b; para revisión ver Gould y col., 1991). En el epitelio olfativo existen cambios morfométricos en ratas hipotiroideas, así como una disminución en el número de neuronas receptoras olfativas (ORN) (Paternostro y Meisami, 1993 y 1994). En el cerebelo, el hipotiroidismo afecta el proceso de diferenciación de las células grano y el establecimiento de sinapsis con las dendritas de las células de Purkinje. En este caso no está disminuido el número de células de Purkinje ya que éstas se generan antes del nacimiento, pero sí está afectado de forma severa el desarrollo de su árbol dendrítico como consecuencia de esta alteración en la densidad de contactos sinápticos entre las

musgosas de las células granos y las dendritas de las neuronas de Purkinje. Para que el tratamiento con T4 pueda ser eficaz en la reversión de los daños éste ha de empezar antes del día postnatal 21 (Legrand, 1979; para revisión ver Legrand, 1984).

Los cambios morfológicos debidos a la falta HT se pueden correlacionar con cambios encontrados en las proteínas constitutivas del citoesqueleto: las HT afectan la síntesis de tubulina y el ensamblaje de microtúbulos (Francon y col., 1977; Fellous y col., 1979; Chaudhury y col., 1985), así como la maduración de proteínas asociadas al citoesqueleto como Taus y MAPs (Aniello y col., 1991) y de neurofilamentos NF-H (Gravel y Hawkes, 1990). Otros estudios que pueden apoyar los cambios encontrados en el número de espinas dendríticas de neuronas piramidales revelan la existencia de una proteína neuronal sustrato de la proteína kinasa C llamada RC3/neurogranina, que es sensible *in vivo* a HT en edad neonatal (Iñiguez y col., 1993) y adulta (Iñiguez y col., 1992) y de localización postsináptica, localizada preferentemente en las espinas dendríticas (Watson y col., 1992). En el deterioro de la arborización dendrítica de las células de Purkinje en el cerebelo podrían estar implicadas también las neurotrofinas. Se ha visto que hay una disminución en inmunoreactividad para el receptor de neurotrofinas de baja afinidad p75NGFr (Legrand y Clos, 1991) y también una reducción en la liberación de NT-3 (neurotrofina-3) por parte de las células grano (Lindholm y col., 1993).

#### **1.4. Glía radial y migración neuronal.**

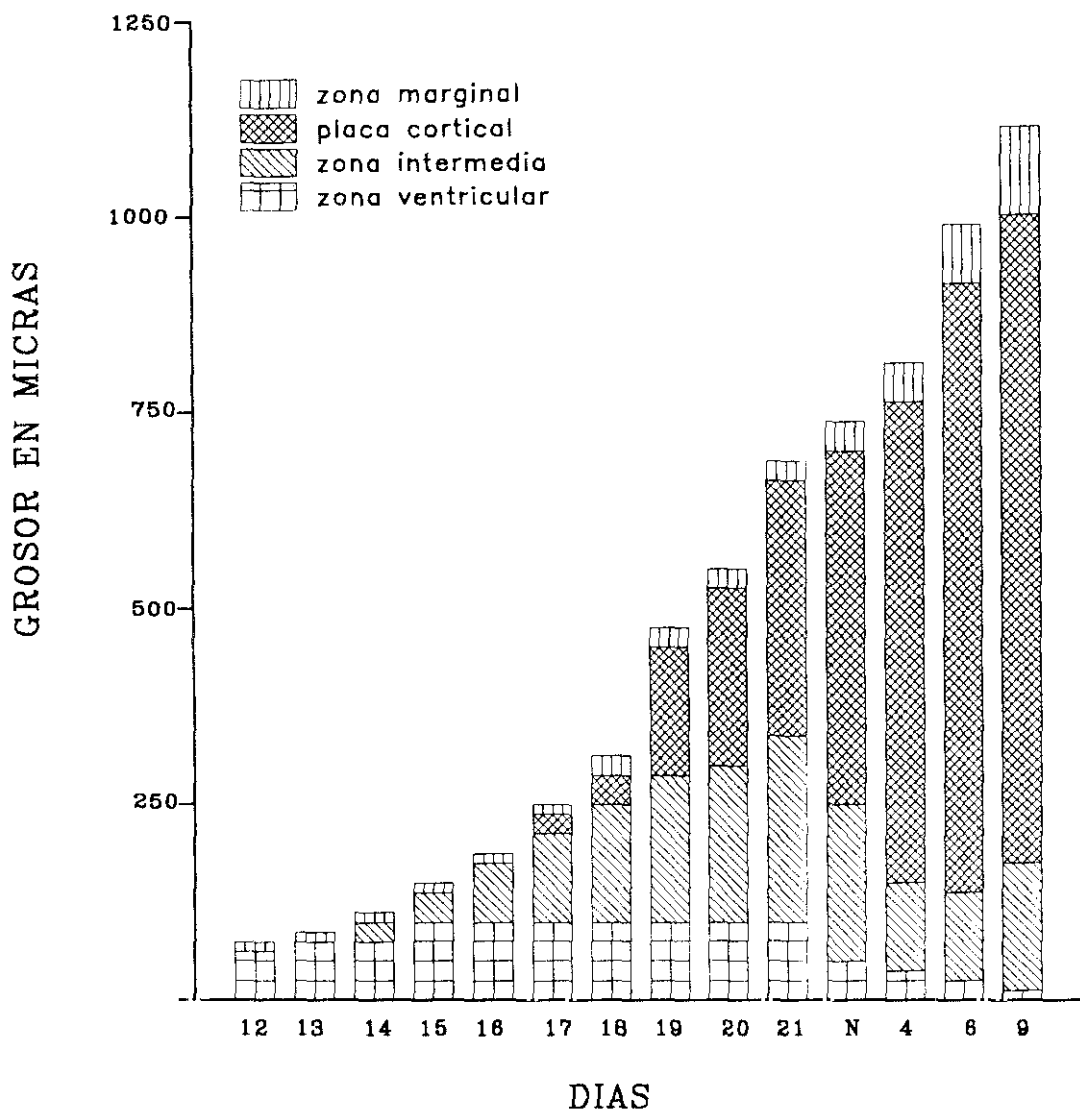
##### **1.4.1. Formación de capas en corteza cerebral y factores que la afectan**

La migración neuronal en la corteza cerebral de la rata ha sido ampliamente estudiada. Se sabe que en las primeras fases del desarrollo de la corteza cerebral, ésta

consta de un epitelio columnar pseudoestratificado que se divide en dos zonas (figura 3): una zona ventricular que contiene los cuerpos celulares de los neuroblastos y una zona marginal que contiene sólo procesos. Las primeras neuronas que terminan su última división mitótica en edad embrionaria 13 ó 14 van a situarse en la zona marginal (células Cajal-Retzius de la futura capa I) o bien formarán la subplaca (futura capa VIb). Posteriormente y hasta edad embrionaria 20 todas aquellas que terminan su última mitosis empiezan a migrar desde la zona ventricular y van a formar la placa cortical que estará localizada entre la zona marginal y la subplaca. La placa cortical se organiza de tal forma que las neuronas generadas antes en el tiempo irán siendo desplazadas hacia abajo sucesivamente por las neuronas que se generan después. Las primeras neuronas generadas ocuparán por tanto las capas más profundas de la corteza mientras que las últimas que se han dividido formarán las capas más superficiales; es lo que se denomina un gradiente *inside-out* (Angevine y Sidman, 1961; Berry y Rogers, 1965; Hicks y D'Amato, 1968; Bayer y Altman, 1991). Durante el proceso descrito las neuronas post-mitóticas se encuentran estrechamente ligadas a procesos gliales y presumiblemente son guiadas hacia sus posiciones definitivas por este tipo de glía denominada glía radial (Rakic, 1972 y 1981; Caviness, 1989).

Alteraciones genéticas como la causada por una mutación autosómica recesiva denominada *reeler* que se produce en ratón, provoca una distribución anormal de neuronas en la corteza cerebral en la que no existe ese gradiente descrito y en la que las primeras neuronas generadas ocupan las capas superficiales de la corteza cerebral, incluso invadiendo la zona ocupada por las células de Cajal-Retzius, y las generadas después se van a situar en las capas más profundas (Caviness y Sidman, 1973). Ahora ya se conoce la proteína codificada por el gen *reeler*: se trata de una proteína extracelular presente en la zona marginal denominada *reelin* o CR-50 que es la proteína ausente en estos mutantes y la que pudiera establecer muy probablemente un límite invisible a la migración en la parte inferior de la zona marginal (para revisión ver Rakic y col., 1995). Otros factores epigenéticos como por ejemplo el etanol (Miller, 1986; Miller y Robertson, 1993) y la cocaína (Gressens y col., 1992) pueden afectar la corticogénesis provocando una alteración en la neurogénesis y en la disposición de la glía radial lo que da lugar a una





**Fig. 3.** La gráfica muestra las variaciones de grosor (en  $\mu\text{m}$ ) de las distintas zonas de la corteza cerebral durante el desarrollo fetal y neonatal. N indica día del nacimiento. Los datos están obtenidos de un trabajo de Derer (1972), se ha seguido un esquema que está contenido en dicho trabajo el cual no hace referencia a la aparición de la subplaca.

distribución anormal de neuronas en la corteza cerebral.

Como ya hemos visto en apartados anteriores en el feto humano aumenta mucho la concentración de receptores tiroideos durante el periodo de multiplicación de neuroblastos, y quizás el déficit de HT puede afectar de forma importante el proceso de neurogénesis y contribuir en gran medida a la patología cortical del cretinismo neurológico. Se ha sugerido que el hipotiroidismo origina una disminución de la proliferación celular en la corteza cerebelar de la rata (Nicholson y Altman, 1972); y aunque estudios posteriores no han mostrado cambios en la duración de las fases del ciclo celular ni en la zona ventricular de la corteza cerebral ni en la capa granular externa del cerebelo (Lewis y col., 1976), recientemente se ha demostrado un patrón anormal en la distribución de neuronas de la corteza auditiva en ratas tratadas con MMI (Lucio y col., 1996 aceptado en prensa) lo que aumenta el interés en estos momentos por saber si la glía radial podría contribuir en algo a la formación de este patrón cortical alterado en ratas hipotiroideas.

#### **1.4.2. Génesis del hipocampo y disposición de la glía radial.**

En el proceso de formación del hipocampo las neuronas que han terminado su última división migran desde el neuroepitelio hasta su destino final en el asta de Ammon o el giro dentado coincidiendo en el tiempo con la formación de la glía radial (Rickmann y col., 1987), situándose las primeras neuronas en CA1 a partir de E-18 y formándose ya posteriormente CA3 y la fascia dentada (Altman y Bayer, 1990a, 1990b y 1990c). La migración de las neuronas piramidales del hipocampo parece tener lugar a través de la glía radial. Los núcleos gliales se encuentran también en la zona ventricular, al igual que en la corteza cerebral, y parecen dirigir sus procesos hacia una densa banda glial supragranular donde son anclados. Por el contrario la ruta mayoritaria seguida por las células grano parece partir de la zona más ventral del neuroepitelio, y atravesar la fimbria hasta alcanzar su posición en el giro dentado. La sinaptogénesis tiene lugar en

periodo postnatal, el área cubierta por el árbol dendrítico de las células grano, denominada capa molecular recibe aferencias principalmente de la corteza entorrinal y del septum. Los axones de las células grano denominados fibras musgosas hacen sinapsis sobre las células piramidales de CA3 y éstas a su vez envían las denominadas colaterales de Schaffer sobre las piramidales de CA1. Dentro del proceso de formación del hipocampo se ha prestado especial interés en el estudio del hipotiroidismo al giro dentado, donde disminuye la proliferación celular (Lauder, 1989) y se retrasa la sinaptogénesis (Ramie y Rabie, 1990) lo que precede a posteriores alteraciones morfológicas en las fibras musgosas (Madeira y Paula-Barbosa, 1993), CA1 y CA3 (para revisión ver Gould y col., 1991), pero no se sabe hasta ahora si el hipotiroidismo puede afectar la migración de las neuronas piramidales del hipocampo.

#### **1.4.3. Efecto de hormonas tiroideas sobre la astroglia.**

Los efectos de T3 y T4 en astrocitos y más concretamente en la expresión del marcador característico de astroglia, la proteína fibrilar ácida de glía (GFAP), son bastante discutidos. Si consideramos un tipo especial de glía, la glía de Bergmann del cerebelo, Sugisaki sugiere que las células gliales de Bergmann son morfológicamente normales en el ratón mutante hipotiroideo *hyt/hyt* (Sugisaki y col., 1991), aunque en un trabajo posterior concluye que la T4 es indispensable para la correcta maduración de éstas (Sugisaki y Noguchi 1992). Respecto a los astrocitos y sus precursores se ha postulado que la deficiencia tiroidea en la rata puede alterar la maduración de astrocitos, disminuyendo la expresión de GFAP en hipocampo en edad fetal (Martínez-Galán y col., 1994) y neonatal (Ramie y Rabie, 1988), y produciendo hiperplasia astrogliar en cerebelo (Faivre-Sarrailh y col., 1991). Según otros autores, en ratas hipotiroideas se observa un aumento en el número de astrocitos en cerebelo, hipocampo y corteza cerebral a los 15 días de edad neonatal (Patel y col., 1989). Estudios realizados *in vitro* tampoco parecen aclarar demasiado, ya que los astrocitos son extraídos de su microentorno neuronal y no

están presentes además otros factores como hormonas sexuales, glucocorticoides, factores de crecimiento, etc. que pudieran interactuar *in vivo* con las HT. Un tratamiento con T3 en el medio de cultivo parece disminuir la expresión de GFAP (Andres-Barquín y col., 1994), mientras que si además de T3 le añadimos insulina al medio conseguimos un efecto sinérgico en el que aumenta la cantidad de GFAP y el número de procesos por célula (Aizenman y De Vellis, 1987). En el nivel molecular se ha visto que en el promotor del gen que codifica para GFAP existe un sitio de unión para el complejo AP1 (Masood y col., 1993) y que los receptores tiroideos son capaces de inhibir el promotor de c-fos y reprimir la activación génica dependiente de AP1 (Zhang y col., 1991). Parece por tanto que todavía es complicado el explicar que ocurre y cómo se afectan los astrocitos con los niveles de T3 y T4 en las distintas partes del cerebro durante el desarrollo neonatal, aunque en el futuro esperamos que se pueda determinar de forma más precisa.

## **1.5. Efectos de déficit tiroideos en mielinización.**

### **1.5.1. Influencia de la triyodotironina en oligodendroglía.**

Ha sido ampliamente demostrado que los oligodendrocitos son muy sensibles a los efectos de HT; en cerebros hipotiroideos disminuye más del 30% del peso seco de mielina (Balazs y col., 1969), la cantidad de colesterol, cerebrósidos, sulfátidos, glucolípidos, sulfolípidos y gangliósidos en las vainas de mielina está también reducida (Walravens y Chase, 1969; Flyn col., 1977; Bhat y col., 1981), así como la actividad de enzimas implicadas en la síntesis de lípidos de mielina como la cerebrósido sulfotransferasa y las galactosil transferasas (Bhat y col., 1979). En ratas hipotiroideas hay una disminución en la expresión de por lo menos tres proteínas de mielina a los 15 días de edad: la proteína básica de mielina (MBP), la proteína proteolipídica (PLP) y la glicoproteína asociada a mielina (MAG) (Muñoz y col., 1991). La MBP es una proteína

extrínseca que viene a representar un 25-30% de la proteína total de mielina. Se ha deducido mediante ratones mutantes nulos que esta proteína está implicada de forma importante en estabilizar dentro de los espacios citoplasmáticos las interacciones de las membranas lipídicas que forman la vaina de mielina (Ganser y Kirschner, 1980; Rosenbluth, 1980). Se ha propuesto que la T3 puede regularla a nivel pretranscripcional, ya que se ha identificado un sitio de unión al DNA para el receptor de T3 en el promotor del gen de la MBP (Farsetti y col., 1991), y también puede actuar a nivel postranscripcional aumentando la estabilidad del RNAm de esta proteína (Matthieu y col., 1990). La PLP, que es una proteína transmembrana, constituye alrededor del 50% de la proteína total de mielina y también está encargada de compactar la vaina de mielina. Esto se ha comprobado mediante ratones mutantes nulos para PLP en los que se ha visto que disminuye la conductancia en un 50% en el nervio óptico y se han observado mediante microscopia electrónica (ME) amplios espacios extracelulares entre las lamelas por lo que se ha propuesto que los dominios hidrofílicos extracelulares de PLP son claves en la adhesión de las caras externas de las membranas de la vaina de mielina (Boison y col., 1995; Gutiérrez y col., 1995). Finalmente se ha sugerido que MAG, que comprende aproximadamente el 1% de la proteína total de mielina, es la responsable de la adhesión del oligodendrocito con las neuronas (Poltorak y col., 1987), y a pesar de que su presencia está disminuida en hipotiroidismo neonatal, ésta alcanza un nivel normal en el cerebro de la rata hipotiroidea a los 30 días de edad (Rodríguez-Peña y col., 1993). De estas tres proteínas por tanto, de la que más evidencias tenemos del control directo de T3 sobre su expresión es de la MBP, ésto y la disponibilidad de buenos anticuerpos comerciales contra esta proteína, nos ha llevado a tomar la cantidad de MBP como parámetro eficaz para medir el efecto de nuestros modelos experimentales de hipotiroidismo sobre el cerebro en una estructura como el estriado, cuya mielinización pensamos que podría ser clave en la deficiencia motora observada en el cretinismo neurológico.

## 2. OBJETIVOS

En el presente trabajo nos plantemos estudiar de forma cuantitativa los efectos de las DPY y del MMI sobre diversos procesos que suceden durante el desarrollo del SNC de la rata, como son la neurogénesis, migración neuronal y mielinización. Para estudiar la neurogénesis y migración neuronal se han realizado experimentos con timidina tritiada y se han utilizado métodos inmuncitoquímicos con los marcadores gliales que hemos considerado adecuados para este fin. Por ello se plantean los tres objetivos siguientes:

1) Estudiar cuantitativamente el efecto de las DPY y el MMI en la maduración de la glía radial en el hipocampo en edad fetal, ya que en esta estructura, el inicio en la expresión de uno de los marcadores gliales utilizado (GFAP) sucede antes que en la corteza cerebral, lo que es muy útil para estudiar la maduración de la glía radial antes del nacimiento. Los resultados obtenidos en este estudio nos ayudarán a comprender mejor lo que sucede durante la maduración de la glía en la corteza cerebral.

2) Estudiar cuantitativamente el efecto de las DPY y el MMI en la maduración de la glía radial en la corteza cerebral en edad fetal y neonatal. Si encontramos que la glía radial está deteriorada en su estructura, esto podría causar una alteración en la migración neuronal y que existiera un número significativo de neuronas que ocupasen capas corticales que en realidad no les hubiera correspondido en función del día en que fueron generadas.

3) Estudiar cuantitativamente el efecto de las DPY en la neurogénesis por medio de experimentos con timidina tritiada, que nos permitan averiguar junto con los datos obtenidos en el objetivo 2 si la deficiencia de HT provocada por el déficit de yodo ha provocado alguna alteración en el patrón de migración neuronal y en la formación de capas corticales.

El último de los procesos que hemos mencionado y que ha sido objeto de estudio por nuestra parte es la mielinización. Para saber cómo evoluciona la mielinización en los dos modelos experimentales que hemos utilizados, se ha tomado como parámetro la densidad superficial de una proteína característica de los oligodendrocitos y presente en las vainas de mielina. Por ello se plantea el último objetivo:

4) Comparar de forma cuantitativa los diferentes efectos que producen las DPY y el MMI en el inicio de la mielinización de las fibras que atraviesan el estriado, y de que forma este efecto se mantiene o desaparece en el periodo postnatal.

### 3. MATERIAL Y METODOS

#### 3.1 Animales de experimentación.

Se han utilizado ratas Wistar criadas en el animalario del Instituto Cajal y en el animalario del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Madrid. Las camadas se igualaron a ocho crías en el día del nacimiento y fueron mantenidas en condiciones controladas de luz y oscuridad (12h-12h), de temperatura (22 °C) y de humedad. Se ha considerado día embrionario cero (E-0) como el día en que encontramos espermatozoides mediante la realización de un frotis vaginal. El día del nacimiento de las crías que solía ocurrir normalmente alrededor de E-22 fue tomado como postnatal cero (P-0).

Los animales experimentales fueron sacrificados a distintas edades: E-21, P-5, P-10, P-15, P-20, P-22 y P-32, anestesiándose previamente con Equitesín (0.3 ml/100 gr de peso), y perfundidos como se describe más adelante. Las distintas condiciones a las que han sido sometidas las madres gestantes y posteriormente los neonatos sacrificados después del destete son las siguientes:

- Ratas C, que fueron ratas normales o controles alimentadas con pienso compuesto y agua *ad libitum*.
- Ratas MMI, constituidas por ratas alimentadas con pienso compuesto a las que se les suministró 2-mercapto-1-metilimidazol (MMI) al 0.02 % en el agua de bebida. Se empezó el tratamiento con las madres de estos animales desde los diez días antes de ser cruzadas. Posteriormente se mantuvo a los animales postnatales después del destete también a MMI hasta el momento de ser sacrificados. El MMI como ya se indicó (apartado 1.2) inhibe la incorporación de yodo en los residuos tirosilo de la tiroglobulina, bloqueando la síntesis de hormonas tiroideas maternas y fetales (Morreale de Escobar y col., 1989).
- Ratas L, las cuales están alimentadas con una dieta pobre en yodo (DPY), según el modelo experimental de Chen y col. (1986) que intenta reproducir las condiciones de las



personas que viven en zonas de bocio endémico. De acuerdo con este modelo las ratas fueron sometidas a una DPY desde al menos tres meses antes de ser cruzadas. Las crías resultantes de este cruce fueron descartadas y las madres fueron cruzadas inmediatamente después. Las camadas resultantes de este segundo cruce constituyen ya el grupo L y aquellas sacrificadas después del destete recibieron también la misma dieta DPY. Los animales así tratados constituyen hasta el presente el modelo experimental más adecuado para reproducir el cretinismo endémico. Las dietas fueron hechas en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, en el laboratorio de los Drs F.Escobar y G. Morreale de Escobar, y constaban de harina de maíz, gluten de trigo, levadura de cerveza, sales (como NaCl y CaCO<sub>4</sub> principalmente), vitaminas, aminoácidos y aceites con lo que el contenido final de yodo en la mezcla era aproximadamente de 0.02 a 0.04 µg de yodo / g de comida.

- Ratas LI, éstas han nacido en condiciones similares a las anteriores pero han recibido en la DPY una suplementación de yoduro potásico, habiendo ingerido 10 µg de yodo / día.

- Ratas LP, ratas que han recibido DPY pero suplementadas con cantidades muy pequeñas de perclorato potásico (0.005%). Esto fue necesario porque durante el periodo de lactancia y debido a un incremento de la disponibilidad de yodo a través de la leche materna que provoca un ligero aumento de la T4 en suero y cerebro (Escobar y col. 1987), y que, junto con el incremento en el nacimiento de la actividad en el cerebro de la desyodasa tipo II, provocan unos niveles casi normales de T3 cerebral (Obregón y col., 1991). Para evitarlo por tanto se añade a la dieta perclorato potásico, el cual interfiere en la captación de yodo en la glándula mamaria y presumiblemente en el incremento de yodo provocado en las crías por la leche materna (Chaouaha-Chekir y col., 1983).

Las ratas C y MMI fueron criadas en el animalario del Instituto Cajal y las ratas LI, L y LP lo fueron en el animalario del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Madrid.

### **3.2. Control del hipotiroidismo**

El grado de hipotiroidismo de las distintas condiciones fue llevado a cabo mediante las determinaciones de T3 y T4 por radioinmunoensayo (RIA) en tejido fresco (Obregón y col., 1978; Morreale de Escobar y col., 1985) de ratas de las mismas camadas que las utilizadas para hacer el estudio morfológico. Para ello se perfundieron los embriones y/o crías con salino, se extrajeron sus cerebros e hígados y se congelaron a -70° C hasta su procesamiento.

En los experimentos realizados con MMI y con objeto de tener un control preciso del nivel de T3 y T4 de las madres en el momento del cruce se determinaron HT en suero de ratas hembras C y MMI a los 0, 5 y 10 días de empezar el tratamiento con MMI, en el día 10 del experimento fueron cruzadas y de las ratas madres preñadas obtuvimos suero 7 días después. Todos los RIA fueron realizados en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, en el laboratorio de los Drs F.Escobar y G. Morreale de Escobar

Además de las medidas de T3 y T4 también se registró el peso corporal de los fetos y las crías de las diversas edades y condiciones.

### **3.3. Inmunohistoquímica.**

Se seleccionaron los anticuerpos que se han considerado más adecuados para marcar axones mielinizados y glía radial en distintos estados de maduración. Para marcar mielina se escogió un anticuerpo específico contra la MBP como ya se ha especificado en el apartado 1.5. Para identificar glía radial se utilizaron dos tipos de anticuerpos: RAT-401 y anti-GFAP. El anticuerpo RAT-401 marca un filamento intermedio llamado nestina característico de células progenitoras bipotenciales (gliales/neuronales) y posteriormente

de glía radial (Hockfield y Mckay, 1989) y GFAP es un marcador típico de astrocitos como hemos visto en el apartado 1.4.3. A este tipo de glía radial marcada por RAT-401 la hemos llamado glía radial “inmadura”, y a la glía radial que expresa GFAP la hemos denominado glía radial “madura”, ya que la expresión de nestina es anterior en el tiempo a la expresión de GFAP y esta expresión de GFAP conlleva en muchos casos la maduración de la glía radial para su posterior transformación en astrocitos. Aunque la misma célula glial pueda coexpresar nestina y GFAP, el descubrimiento de éstos y otros antígenos nos puede dar una idea aproximada del estado de maduración en el que ésta se encuentra (para revisión ver Cameron y Rakic, 1991). Para cada tipo de anticuerpo empleado se probaron diversos tipos de fijadores y distintos tiempos de postfijación hasta conseguir el marcaje que consideramos más óptimo.

### **3.3.1. Marcaje de mielina en estriado utilizando anticuerpos monoclonales contra MBP**

Ratas C, MMI, LI y LP de 5, 10, 15, 20 y 32 días postnatales fueron perfundidas a través de la aorta con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PB) 0.1M pH 7,2-7,4. Los cerebros permanecieron 4 horas en el mismo fijador y se incluyeron posteriormente en sucrosa al 30% en tampón fosfato salino (PBS) 0.1 M de 12 a 24 horas. Una vez crioprottegidos se cortaron por congelación en un microtomo de deslizamiento, obteniendo secciones coronales de 50  $\mu\text{m}$  de espesor que contuvieran la comisura anterior. Tras una serie de lavados en PBS 0.1 M se incubaron los cortes en  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3% durante 30 min para inhibir la peroxidasa endógena, después de varios lavados en PBS se colocaron 30 min en suero normal de caballo con objeto de evitar en lo posible el marcaje inespecífico y sin lavar se incubaron los cortes dos días a 4°C en un anticuerpo monoclonal anti-MBP (Boheringer) a dilución 1:100 en PBS conteniendo seroálbumina bovina (BSA) al 0.1%.

A los dos días se volvieron a lavar en PBS, se incubaron en un anti-ratón

biotinilado desarrollado en cabra de Vector 1:100 durante 1 h, posteriormente y tras varios lavados se incubaron 80 min en una solución conteniendo avidina y biotin-peroxidasa (ABC de Vector). Se lavaron esta vez en PBS y posteriormente en tampón acetato 0.1M. Más adelante se incubaron los cortes 11 min en una solución que contenía DAB al 0.05 %, sulfamato de níquel al 1% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.003 % en tampón acetato 0.1M. Se cortó la reacción con tampón acetato y se lavaron los cortes varias veces en tampón acetato y PBS. Los cortes se montaron sobre portas gelatinizados en agua destilada, se deshidrataron y se cubrieron utilizando DPX.

### **3.3.2. Identificación de procesos de glía radial “madura” en hipocampo y corteza cerebral mediante el uso de anticuerpos policlonales para GFAP**

Ratas C, MMI, LI, L y LP fueron sacrificadas en E-21. En edad postnatal se sacrificaron ratas C, MMI, LI y LP en P-5 y P-10, prescindiéndose de la condición L cuya morfología cerebral y peso (ver resultados) no difería en E-21 de las ratas LP. Se siguió el protocolo anterior con las siguientes variaciones:

- Se perfundieron las crías y los embriones con formaldehído al 10% en PB 0.1M. El tiempo de postfijación fue de varios días en el mismo fijador.
- Tras la crioprotección, los cerebros fueron cortados por congelación en un microtomo de deslizamiento, obteniendo cortes que contuvieran hipocampo o área visual de la corteza cerebral
- El anticuerpo primario fue un anti-GFAP policlonal (Dakopatts), se utilizó 1:100 en PBS 0.01% de Tritón.
- En vez del método de la avidina-biotina se usó como anticuerpo secundario un anti-conejo desarrollado en cabra de Sigma 1:50 en PBS y posteriormente el complejo peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) de Sigma desarrollado en conejo al 1:200 en PBS

### **3.3.3. Identificación de procesos de glía radial “inmadura” en hipocampo y corteza cerebral utilizando anticuerpos monoclonales contra nestina**

Se sacrificaron ratas de las mismas condiciones que para el marcaje de glía radial “madura”: ratas C, MMI, LI, L y LP fueron sacrificadas en E-21. Para experimentos en edad postnatal también se prescindió de las ratas L (ver apartado 3.3.2 y resultados). Ratas C, MMI, LI y LP se sacrificaron en P-5 y P-10. Las variaciones sobre el protocolo anterior en el que se utilizó anti-GFAP son las siguientes:

- La perfusión fue realizada también con formaldehído al 10% y postfijación de varios días, los tiempos fueron los mismos que para el paso anterior y los anticuerpos utilizados después fueron:
- el anticuerpo primario utilizado fue RAT-401 procedente del “Developmental Studies Hybridoma Bank” y obtenido a través de la Dra. Karen Jensen de la Universidad de Iowa. Se utilizó sin diluir.
- Como anticuerpo secundario se utilizó un anti-ratón 1:100 de Biomakor en PBS
- El complejo PAP de Sigma estaba desarrollado en ratón y se usó esta vez a una dilución 1:800 en PBS.

### **3.4. Autorradiografía.**

Ratas preñadas LI y LP fueron inyectadas una sola vez en los días de gestación E-16 y E-17 con timidina tritiada de Amersham (5  $\mu$ Ci / g de peso) con objeto de marcar principalmente las neuronas que posteriormente iban a formar la capa V de la corteza visual (Bayer y Altman., 1991; Ignacio y col.; 1995). La timidina será empleada para sintetizar DNA por aquellas células que se encuentren en la fase S (fase de síntesis de

material genético) del ciclo celular. Los mayores acúmulos de plata aparecerán en aquellas células que estuvieran en fase S en el momento de inyectar la timidina y que posteriormente no se hayan dividido o lo hayan hecho muy poco ya que la cantidad de radiactividad se irá diluyendo en las células hijas de las sucesivas divisiones. Al cabo de una hora de realizada la inyección, sólo del 5 al 10% de la timidina marcada está presente en la sangre (Cleaver, 1967). La razón por la que solamente se eligieron ratas LI y LP para realizar este experimento se debe a que se estaba realizando paralelamente un estudio con 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) en la corteza auditiva de ratas tratadas con MMI por el laboratorio del Dr. Berbel del Instituto de Neurociencias de Alicante.

#### **3.4.1 Perfusión, inclusión en parafina, obtención de cortes y montado de los mismos.**

Las crías se sacrifican a la edad de 22 días postnatales mediante perfusión a través de la aorta con formaldehído al 10% en PB 0.1M. Después de la perfusión los cerebros permanecieron en el mismo fijador varios días y fueron incluidos en paraplast mediante el siguiente procedimiento:

- Día 1: deshidratación en pasos sucesivos de alcoholes de 50° a 100°
- Día 2: varios pasos de xileno a paraplast
- Día 3: elaboración de los bloques de parafina

Durante el tiempo que los cerebros están en paraplast y antes de la elaboración de los bloques, hemos utilizado una estufa que estuvo a 60° como máximo. Los bloques obtenidos fueron cortados en un microtomo de parafina en secciones coronales de 7  $\mu$ m empezando por la región occipital del cerebro hasta la aparición del cuerpo calloso con el fin de obtener secciones de corteza cerebral que contuvieran área 17. Se montaron los cortes por flotación en portas utilizando una solución de gelatina al 1% y alumbre crómico 0.05% en agua. Posteriormente se desparafinan los portas en pasos

de xilol, alcoholes de graduación descendente, agua destilada y se dejan secar.

#### **3.4.2. Impregnación de los portas en la emulsión fotográfica**

Una vez cortado el material y montado en los correspondientes portaobjetos éstos fueron sumergidos en una emulsión fotográfica Ilford K5D al 50% que estaba a una temperatura de 40° C y en condiciones de oscuridad. Los portas se colocaron en bandejas las cuales se envolvieron en papel fotográfico de plástico y se mantuvieron durante 40 días a 4° C.

#### **3.4.3. Revelado**

También en condiciones de oscuridad los portas fueron sumergidos en revelador D-19 al 20% (p.,v.) durante 4 min, pasaron a una solución de paro (agua destilada con unas gotas de acético), fijados 8 min en fijador Valca de AGFA al 20% (v.,v.) y lavados en agua corriente durante dos horas.

#### **3.4.4. Tinción de Nissl**

Los portas hidratados se sumergieron en tionina pH 4.5, se deshidrataron y se montaron en DPX.

### **3.5. Métodos de cuantificación y análisis estadístico.**

#### **3.5.1. Cuantificación de glía radial en corteza cerebral e hipocampo**

Las edades utilizadas para este estudio fueron E-21 en el caso del hipocampo y E-21, P-5 y P-10 para el área visual de la corteza cerebral. Se calculó la cantidad de glía inmunoreactiva para GFAP y RAT-401 determinando el número de procesos gliales que cruzaban un segmento de 100  $\mu\text{m}$  orientado horizontalmente de la siguiente manera:

- En E-21 se situó el segmento en el borde inferior de las neuronas que forman el área CA1 del hipocampo.
- En E-21 y para el área visual de la corteza cerebral, el segmento se colocó en dos sitios: en el límite entre la subplaca y la placa cortical y después en el límite entre la zona marginal y la placa cortical.
- En P-5 y P-10 el segmento fue situado en el área visual en dos sitios: en el límite entre la capa I y la II/III (corteza superficial) y en el límite entre la capa V y la VI (corteza profunda) según Miller y Robertson (1993).

#### **3.5.2. Densidad superficial de procesos mielinizados**

Para estudiar el desarrollo de la mielinización en el estriado en los distintos grupos experimentales elegimos las edades de P-5, P-10, P-15, P-20 y P-32. Para calcular la cantidad de procesos MBP marcados (figura 4), se colocó una cuadrícula de aproximadamente 0.08  $\text{mm}^2$  (formada por 10 filas y 10 columnas) en las regiones dorsolateral (DL), dorsomedial (DM), ventrolateral (VL), y ventromedial (VM) del estriado. Se controló la anteroposterioridad analizando solamente los cortes más

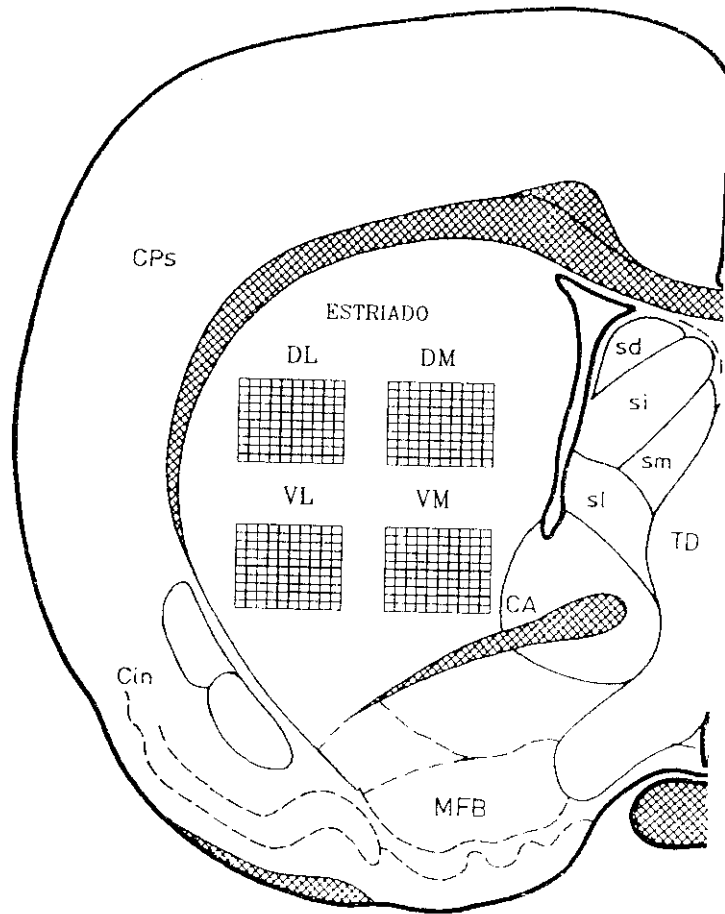


posteriores que contuvieran comisura anterior pero en los que no apareciera globus pallidus, se contó el número de intersecciones horizontales y verticales con la cuadrícula (Weibel, 1979), con lo que se obtuvo una medida de la expresión de MBP denominada densidad superficial de MBP.

Los datos obtenidos posteriormente fueron analizados de tres formas: la primera de ellas en función de cada una de las regiones donde se habían realizado los contajes (estriado DL, VL, VM, DM). La segunda forma como promedio de los datos procedentes de las zonas DL y VL (estriado lateral) y las zonas DM y VM (estriado medial). Y por último la tercera forma de presentar los datos ha sido como promedio de las cuatro zonas DL, VL, VM y DM (estriado total).

### **3.5.3. Estimación del número de neuronas radiactivamente marcadas**

Como ya se ha mencionado en el apartado 3.4 se inyectó timidina tritiada a 2 ratas madres LI y LP en E-16 y otras dos ratas madres LI y LP en E-17, y se sacrificaron las crías en P-22. Para este estudio morfológico se utilizó una cámara Hitachi KP-C501 adaptada a un microscopio Universal de Zeiss y el programa SM-II para visualizar la imagen en un ordenador. Se siguió un criterio conservativo de considerar como positivas sólo las neuronas fuertemente marcadas localizadas en el interior de una sonda de forma rectangular de 0.2 mm de ancho, que situamos en el área visual y que recorría el neuropilo desde la capa I hasta la sustancia blanca. Se utilizó un objetivo de 25x y después se procedió a la reconstrucción de las distintas capas corticales del área 17 y a contar las neuronas que habíamos designado como marcadas en cada capa.



**Fig. 4.** El esquema muestra la zona del estriado donde se han tomado las medidas de densidad superficial de MBP. Se eligieron los cortes que contenían la parte más posterior de la comisura anterior (CA), en cada corte la cuadrícula se colocó una vez en cada una de las 4 zonas en las que se dividió el estriado: dorsolateral (DL), ventrolateral (VL), ventromedial (VM) y dorsomedial (DM). *Corteza parietal (Cps), corteza rinal (Cin), haz medial prosencefálico (MFB), banda diagonal (TD), núcleo septal dorsal (sd), núcleo septal medial (sm), núcleo septal intermedio (si), núcleo septal lateral (sl).*

#### **3.5.4. Análisis estadístico de los datos**

Por tratarse de animales que se criaron en distintos animalarios (ver apartado 3.1), se ha creído conveniente analizar los resultados de pesos corporales así como las determinaciones hormonales por separado (excepto en edad fetal), haciendo las comparaciones estadísticas necesarias entre los grupos cuyo mantenimiento se ha realizado en el mismo animalario: ratas C con ratas MMI, y ratas LI con ratas L y LP. Para determinar las diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los pesos corporales de las distintas condiciones experimentales (C, LI, L, LP y MMI) se utilizó un análisis de varianza de una vía seguido del test de Q en E-21. Posteriormente para determinar diferencias significativas entre los pesos de las distintas condiciones experimentales en edad postnatal (ratas C con ratas MMI y ratas LI con ratas LP) se utilizó el análisis de varianza de dos vías seguido del test de Q. La significación estadística de las diferencias entre los valores medios de los niveles de T3 y T4 en cerebro fue determinada utilizando también el análisis de varianza seguido del test de Q.

Por el contrario los datos obtenidos estudiando glía radial, neuronas radiactivamente marcadas y mielinización se analizaron juntos, ya que no se ha encontrado ninguna diferencia significativa mediante el estudio de estos parámetros en la morfología cerebral de ratas C y LI. En los experimentos de GFAP, MBP, y RAT-401 se tuvieron en cuenta un mínimo de 1 a 2 ratas de cada 3 a 5 camadas por condición y edad estudiada, analizándose 120 cerebros del total de los animales procesados. La significación estadística de las diferencias entre los valores medios se determinó mediante análisis de varianza de una vía (en los datos procedentes del trabajo realizado en hipocampo) o de dos vías (en los datos que corresponden a los trabajos realizados en la corteza cerebral y el estriado), posteriormente las diferencias entre grupos fueron evaluadas mediante el test de Q. Para los experimentos de timidina tritiada fueron inyectadas 2 ratas madres LI y 2 madres LP y se analizaron un total de 8 ratas de 22 días postnatales. Para evaluar diferencias entre ratas LI y LP en cada capa cortical en el

número de neuronas en P-22 (teñidas por el método de Nissl) y en el tanto por ciento de neuronas generadas en E-16 y E-17 utilizamos el test de Student.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Control del hipotiroidismo.

#### 4.1.1. Pesos

Las distintas situaciones experimentales a las que han estado sometidas las ratas tienen diferentes efectos sobre los valores medios ( $\pm$  EEM) de los pesos corporales con respecto a sus controles (figura 5). En todas las edades estudiadas, el MMI produjo una disminución del peso corporal, mientras que en las ratas sometidas a DPY no se observó ninguna alteración significativa en su peso.

En E-21 (figura 5a), la significación estadística entre los valores medios de las distintas condiciones experimentales (C, LI, L, LP, MMI) fueron determinadas por análisis de varianza de una vía seguido del test de Q para evaluar las diferencias entre pares de grupos. Las ratas C tienen un peso significativamente mayor ( $P < 0.001$ ) con respecto a las ratas MMI ( $5.03 \pm 0.12$  g frente a  $3.62 \pm 0.13$  g). No se observaron diferencias en el peso de ratas LI, L y LP (figura 5b) en E-21 ( $4.84 \pm 0.09$  g,  $4.90 \pm 0.13$  g y  $4.58 \pm 0.10$  g, respectivamente).

En el periodo postnatal, para determinar la significación de las diferencias entre los valores medios de los pesos de ratas MMI y sus respectivos controles (C), y entre las ratas LP y sus controles (LI), fue aplicado un análisis de varianza de dos vías seguido del test de Q. Al igual que en E-21, también existen diferencias en los pesos correspondientes a C y MMI en todas las edades estudiadas (figura 5c). En P-5 la diferencia es muy significativa entre ratas C y ratas MMI ( $11.66 \pm 0.315$  g frente a  $6.36 \pm 0.44$  g) con  $P < 0.0001$ . En P-10, entre las ratas C y MMI ( $19.40 \pm 0.58$  g frente a  $8.75$

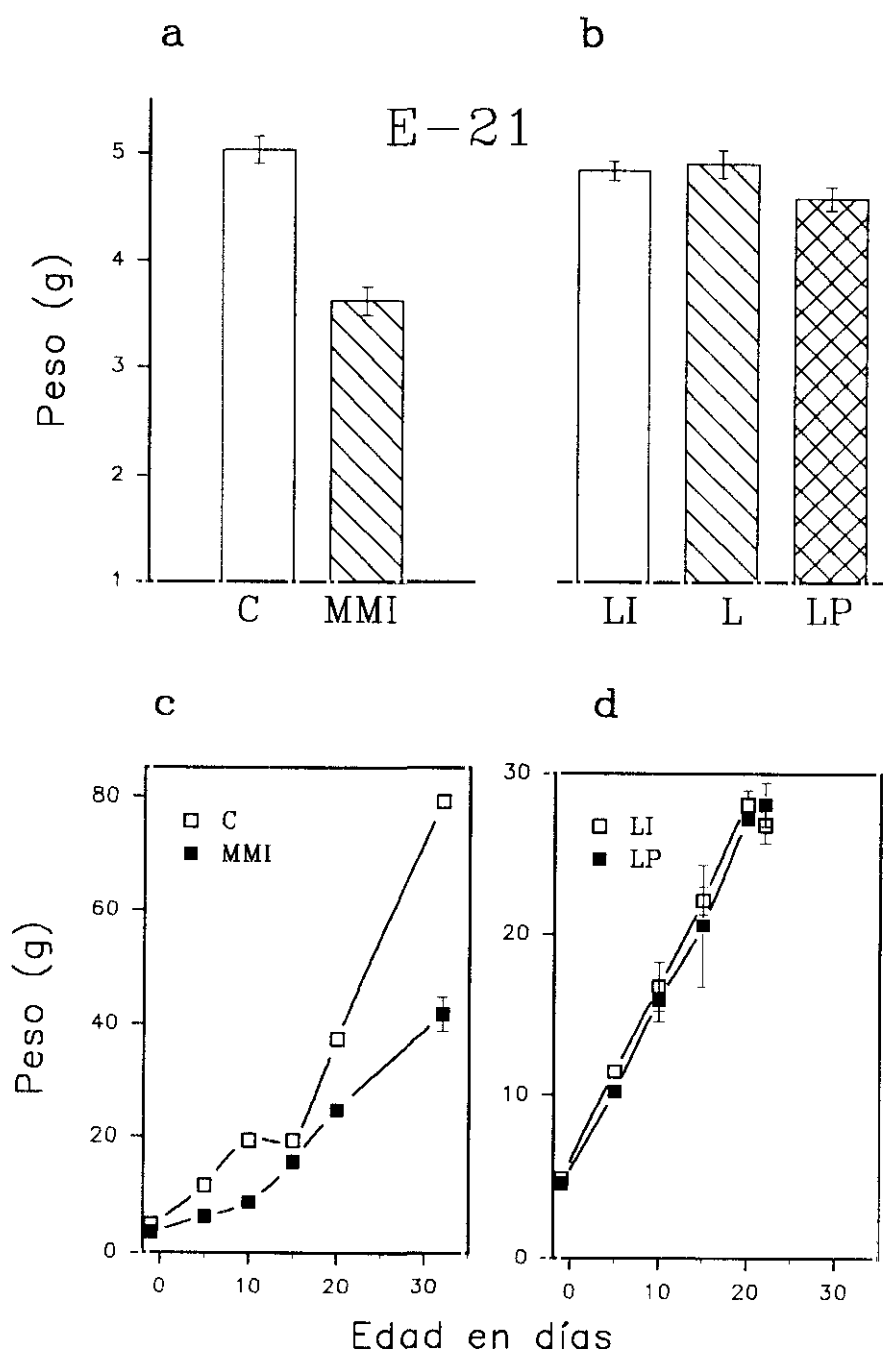
g) la diferencia de pesos es bastante grande todavía ( $P<0.0001$ ). En P-15 la diferencia de pesos entre ratas C y MMI parece disminuir ( $19.4\pm0.58$  g y  $15.7\pm0.267$  g respectivamente) con  $P<0.005$ . En P-20 y P-32 se produce un incremento muy grande de peso en las ratas C con lo que la diferencia con respecto a ratas MMI parece acentuarse aún más en estas edades ( $37.38\pm1.10$  g en P-20 y  $79.17\pm1.32$  g en P-32 en ratas C frente a  $24.73\pm1.15$  g en P-20 y  $41.7\pm3.00$  g en P-32 en ratas MMI) ambas con  $P<0.0001$ .

No encontramos diferencias en los pesos de ratas LI y LP (figura 5d) tampoco durante el periodo postnatal. La razón de que el peso no esté afectado en situaciones de déficit de yodo es porque en estos casos los niveles de T3 en sangre son normales y pueden ser suficientes para regular la GH (ver apartado 1.2). En P-5 los pesos de ratas LI y LP son  $11.46\pm0.24$  g y  $10.20\pm0.45$  g respectivamente. En P-10 los pesos son  $16.75\pm1.5$  g en ratas LI y  $15.92\pm1.30$  g en ratas LP. En P-15 el peso de ratas LI es de  $22.15\pm0.88$  g frente a  $20.56\pm3.84$  g en las LP. Tampoco en P-20 ( $28.11\pm0.88$  g en las LI y  $27.26$  g en las LP), ni en P-22 ( $26.85\pm1.21$  g en ratas LI y  $28.125$  g en ratas LP) observamos diferencias entre ambas condiciones experimentales.

#### **4.1.1. Determinaciones hormonales**

##### **4.1.2.1. Niveles de HT en suero de ratas hembras adultas C y MMI**

Los niveles de T3 y T4 en suero fueron determinados solamente en ratas hembras C y MMI con el fin de evaluar la efectividad del tratamiento con MMI en las ratas madres. La figura 6 muestra los niveles de T3 y T4 en suero de ratas hembras C y ratas tratadas con MMI, desde 10 días antes de ser cruzadas, expresadas en ng de hormona / ml de suero. El MMI produjo una disminución significativa de la cantidad de ambas HT en todas las etapas del tratamiento analizadas (5, 10, 15 y 17 días de tratamiento). En el día 0 ó día de inicio del tratamiento los niveles de T3 de ratas C



**Fig. 5.** Las gráficas a y b muestran los pesos corporales de fetos E-21 en ratas C, MMI, LI, L y LP. En las gráficas c y d tenemos la evolución del peso corporal desde E-21 hasta P-32. Las diferencias entre ratas C y MMI fueron siempre estadísticamente significativas, mientras que los pesos de L y LP fueron siempre similares a LI.

( $0.97 \pm 0.11$  ng/ml) y ratas MMI ( $0.92 \pm 0.08$  ng/ml) eran similares. De igual forma los niveles de T4 en ratas C ( $49.2 \pm 5.88$  ng/ml) y ratas MMI ( $51.85 \pm 3.41$  ng/ml) tampoco mostraron diferencias. En el día 5 del tratamiento ya se obtiene un descenso de T3 en ratas MMI ( $0.31 \pm 0.03$  ng/ml) frente a las ratas C ( $0.75 \pm 0.08$  ng/ml). Los niveles de T4 también descienden ya significativamente a los 5 días en ratas MMI ( $14.07 \pm 1.33$  ng/ml) frente a las ratas C ( $46.942 \pm 10.96$  ng/ml). A los 10 días de tratamiento se cruzaron las ratas (indicado como a en la figura 6). Previamente se les había extraído sangre y se había observado que la disminución de HT en suero era aún mayor que en el día 5 de tratamiento, y que la disminución de T3 en ratas MMI (menos de 0.14 ng/ml) frente a ratas C ( $0.97 \pm 0.04$  ng/ml), y de T4 en MMI ( $6.70 \pm 0.71$  ng/ml) frente a ratas C ( $52.25 \pm 3.45$  ng/ml), alcanzaba ya un nivel mínimo. En el día 17 de tratamiento, el cual corresponde al día embrionario 6 en las ratas preñadas, tenemos también unos niveles de T3 en ratas MMI (menos de 0.15 ng/ml) frente a C ( $0.72 \pm 0.1$  ng/ml), y de T4 en ratas MMI ( $4.5 \pm 1.32$  ng/ml) respecto a C ( $49.32 \pm 5.91$  ng/ml), que nos aseguran que haya un aporte muy bajo de HT de las ratas madres MMI a los fetos durante la gestación.

#### 4.1.2.2. Niveles de HT en cerebro de fetos C, LI, L, LP y MMI en E-21.

Los niveles de T3 y T4 en embriones de 21 días aparecen expresados en pg de hormona/g de cerebro como porcentajes en función de las ratas controles (C y LI) en la figura 7. Los datos de hormonas procedentes de ratas C y MMI se obtuvieron en distinto RIA que los procedentes de ratas LI, L, LP. Por esta razón se consideró que lo mejor era mostrar estos datos expresados en porcentajes en función de los controles. También aparecen indicados estos datos de HT en E-21 (excepto para las ratas L) en las curvas de evolución de HT (figuras 8 y 9) que muestra los niveles de hormonas desde E-21 a P-32 expresados en pg/g (figura 8) y como porcentajes en función de controles (figura 9). En la figura 7 se observa una disminución estadísticamente significativa de T3 en ratas L y un descenso aún mayor en ratas LP y MMI con respecto a C y LI. Las ratas L tienen un 68% de T3 respecto a C, el valor de la T3 en las ratas LP es de un 27% con respecto a C y en las ratas MMI la T3 es un 29% respecto a C. La T4 también es significativamente menor en ratas L, LP y MMI con respecto a C y LI, pero no hay



diferencias entre los grupos de animales hipotiroideos (L, LP y MMI) en sus niveles de T4. En ratas L la cantidad de T4 es un 59% respecto a C, en ratas LP es un 66% de C (no son significativas estas diferencias entre ratas L y ratas LP) y en ratas MMI el valor de T4 es un 56% de C.

#### 4.1.2.3. Niveles de HT en cerebro de ratas C, LI, LP y MMI desde E-21 a P-32.

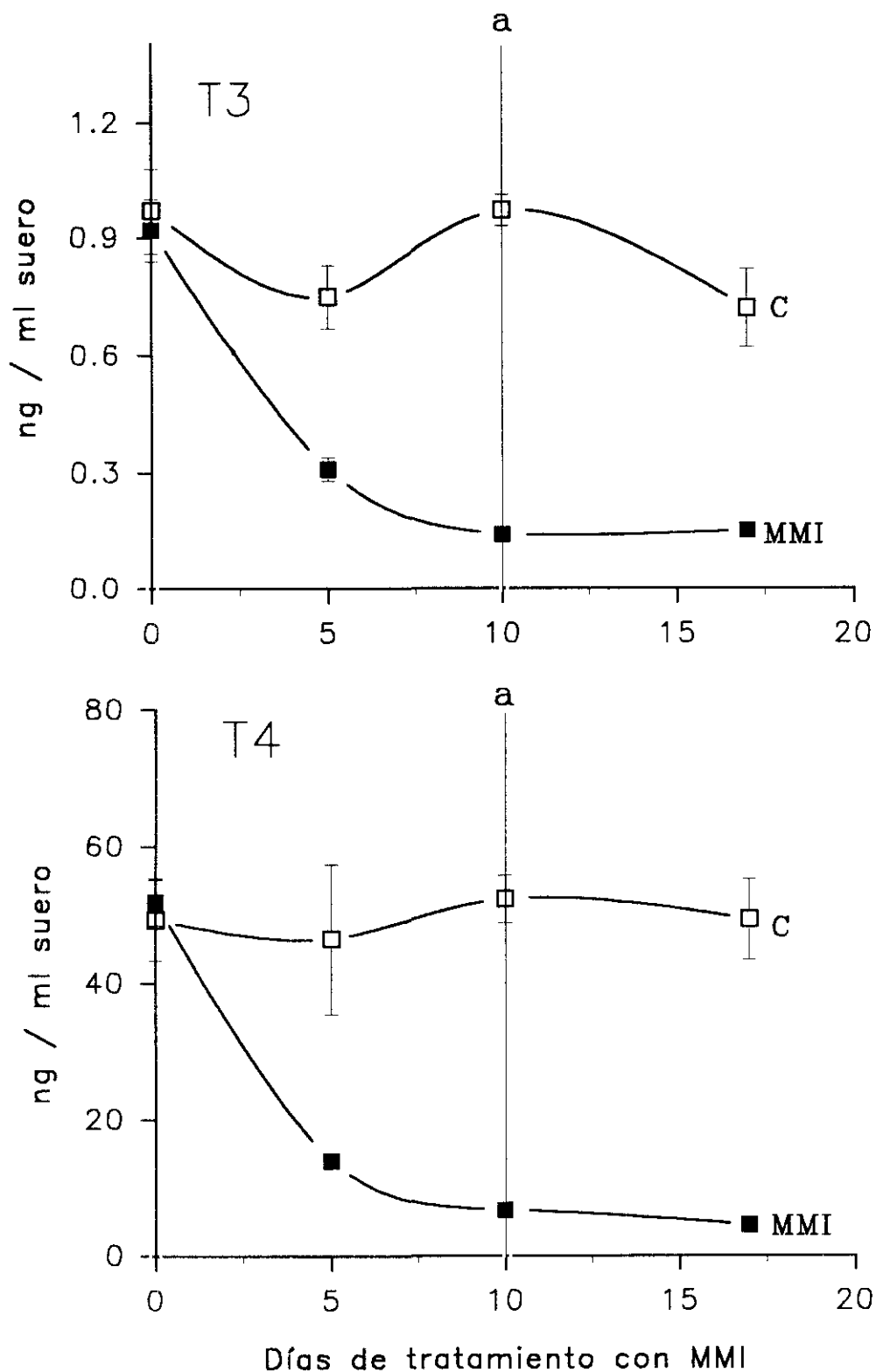
En la figura 8 se ha representado la evolución de los niveles de T3 y T4 durante el desarrollo neonatal, desde E-21 hasta P-32, en ratas controles (C, LI) y en ratas hipotiroideas (LP, MMI) expresados en pg/g. De igual forma que se han presentado los pesos de C y MMI, y de LI y LP, en curvas separadas, hemos representado los niveles de HT de ratas C y MMI de manera independiente de los niveles de ratas LI y LP, ya que las determinaciones hormonales no se hicieron en el mismo RIA. En la figura 9 se muestran estos mismos resultados como porcentajes en función de los controles (C, LI).

Se observa como el efecto del tratamiento con MMI disminuye de forma significativa los niveles de T3 y T4 en casi todas las edades (figuras 8 y 9). Excepto en P-20 donde las ratas MMI parecen recuperarse en sus niveles de T3 (87% con respecto a C). Esto parece estar producido por un marcado aumento de T3 en la tercera semana postnatal que sucede tanto en ratas C ( $4545 \pm 651$  pg/g) como en ratas MMI ( $3715 \pm 489$  pg/g). En el resto de las edades estudiadas la cantidad de T3 y T4 en ratas MMI permanece por debajo de los controles. En E-21 la cantidad de pg/g de T3 en cerebro de ratas MMI es de un 29% con respecto a ratas C. En P-10 se mantiene en un 25% de C y aumenta como ya hemos visto hasta un 87% en P-20 para luego disminuir en P-32 a un 32% de C. La cantidad de T4 en cerebro de ratas MMI es un 56% respecto a C en E-21, un 24% de C en P-10, un 64% en P-20 y un 40% en P-32.

La disminución de T3 y T4 que se consigue en ratas LP (figuras 8 y 9) no es tan pronunciada durante todo el desarrollo neonatal como el que conseguimos en ratas MMI e incluso en P-5 los niveles de T3 en ratas LP ( $1255 \pm 174$  pg/g) son un 143 % con

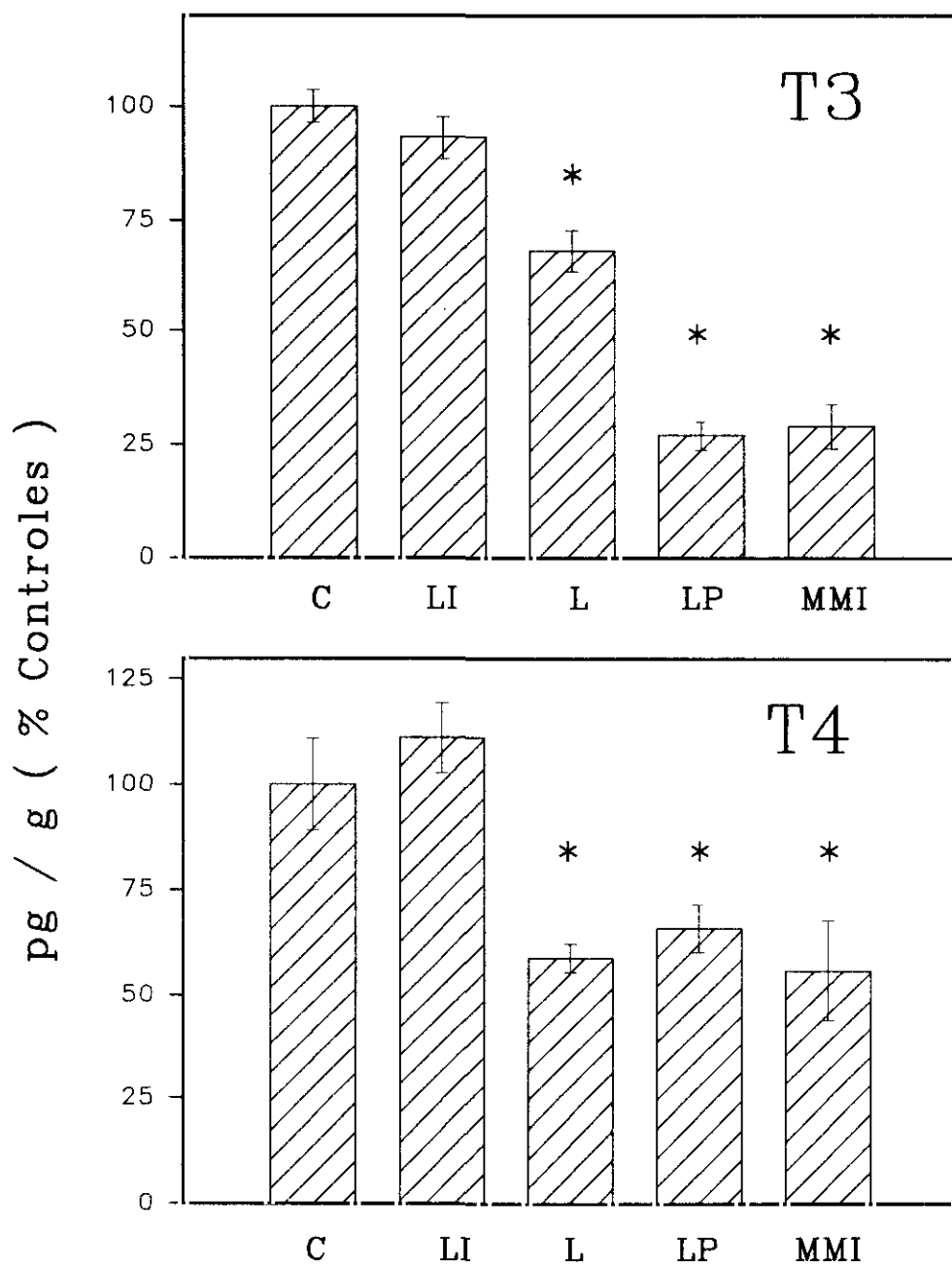
respecto a LI ( $854 \pm 85$  pg/g), lo que probablemente puede estar relacionado con dos hechos que suceden durante el nacimiento en ratas que han sido hechas hipotiroideas mediante la utilización de DPY. El primero de ellos es que el yodo acumulado en la glándula mamaria empieza a ser ya disponible para el neonato a través de la leche materna (Potter y col., 1959), y el segundo de ellos es un aumento en la actividad de la desyodasa tipo II cerebral en estas ratas mantenidas a DPY que tiene lugar también durante el nacimiento (Obregón y col., 1991). La cantidad de T3 en E-21 en ratas LP es de un 27% respecto a las ratas LI. En P-5 este aumento de T3 al que antes nos hemos referido es incluso estadísticamente significativo con respecto a LI. En P-10 la cantidad T3 es de un 64% respecto a LI, en P-20 es de un 57% y en P-32 vuelve a aumentar la T3 hasta un 87% de C ( $1895 \pm 151$  pg/g en ratas LP y  $2514 \pm 41$  pg/g en ratas LI), lo que induce a pensar que días antes de P-32 se ha producido otra subida de la actividad desyodasa tipo II en cerebro. El mecanismo de respuesta a la deficiencia de yodo de las ratas LP también se refleja en los niveles de T4 en los primeros días postnatales, ya que en E-21 las ratas LP tiene un 66% de T4 con respecto a ratas LI y posteriormente alcanzan en P-5 y P-10 los niveles de las ratas LI. En P-5 la cantidad de T4 en ratas LP ( $1590 \pm 193$  pg/g) es un 110% respecto a las ratas LI ( $1436 \pm 323$  pg/g), y en P-10 es de un 115% en ratas LP ( $4078 \pm 57$  pg/g) con respecto a LI ( $3542 \pm 353$  pg/g). No obstante al final de la segunda semana postnatal los niveles de T4 descienden drásticamente en ratas LP, 20% de T4 en P-20 y 16% de T4 en P-32 en ratas LP respecto a LI. Todos estos resultados obtenidos en animales LP indican que la rata posee mecanismos muy complejos para intentar mantener unos niveles de HT adecuados en el cerebro durante las dos primeras semanas postnatales con objeto de asegurar un aporte suficiente de T3, lo que pudiera ser necesario para que se llevaran a cabo ciertos procesos que suceden durante este periodo en el SNC.

## RATAS HEMBRAS



**Fig. 6.** Valores medios ( $\pm$  EEM) de las concentraciones de T3 y T4 en suero de ratas hembras adultas a las que se les suministró MMI. En el día de tratamiento 10 las ratas fueron cruzadas (a) con los machos y 7 días después se le extrajo suero. Las diferencias entre C y MMI fueron siempre estadísticamente significativas. Se puede observar como en el día del cruce las ratas MMI alcanzan ya unos niveles muy bajos de HT con lo que aseguramos un bajo aporte de hormonas a los fetos.

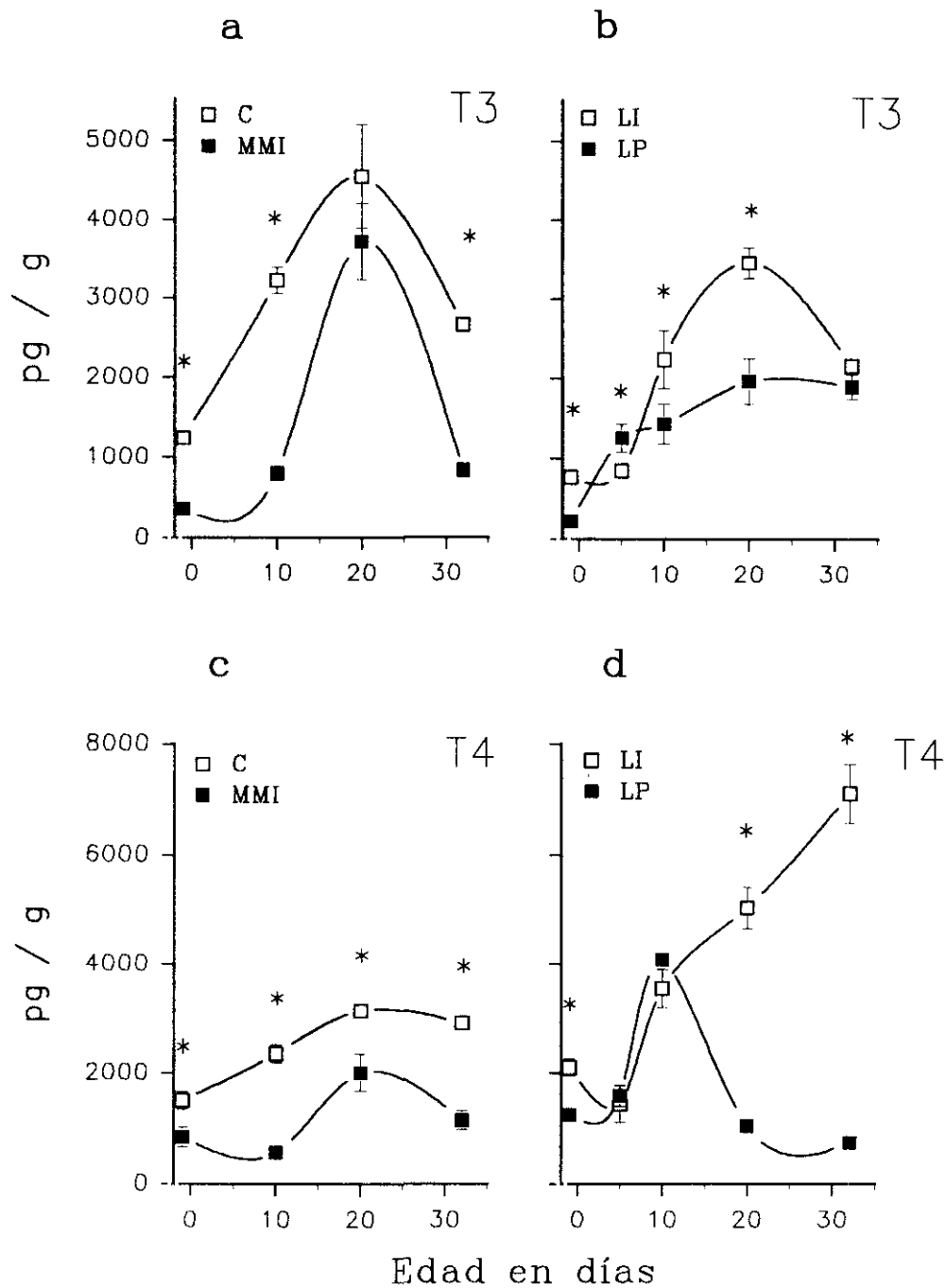
E-21  
CEREBRO



**Fig. 7.** Valor medio ( $\pm$  EEM) de las concentraciones de T3 y T4 medidas en cerebro de fetos E-21 de las condiciones LI, L, LP y MMI expresados en función de las ratas C que fueron tomados como el 100 %. Se observa como ha disminuido la T3 y la T4 en ratas L, LP y MMI. El mayor descenso se produce en los niveles de T3 en ratas LP y MMI.

\* Diferencia estadísticamente significativa con respecto a C. Test de Q,  $P < 0.05$ .

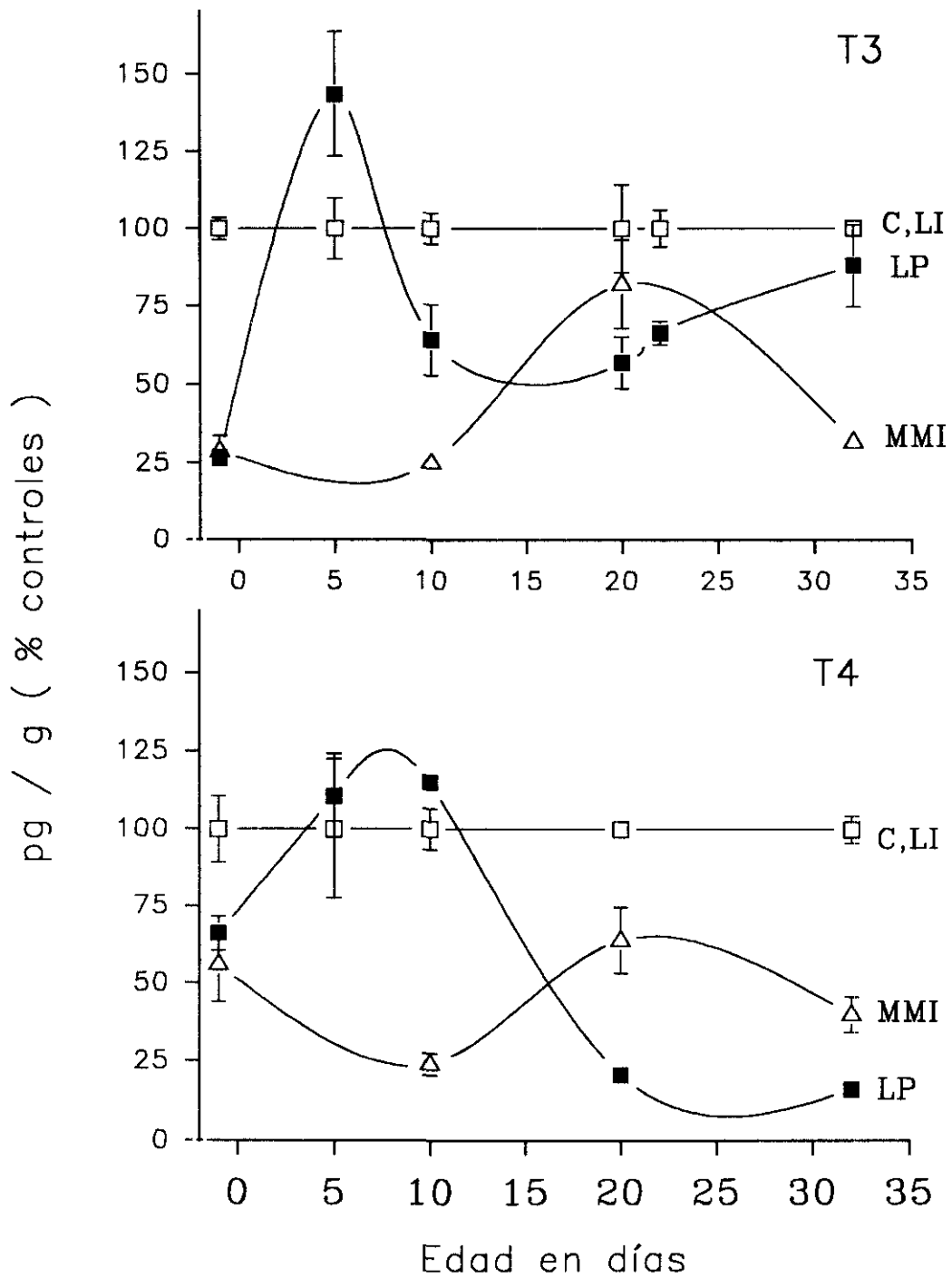
## CEREBRO



**Fig. 8.** Valores medios ( $\pm$  EEM) de las concentraciones de T3 y T4 medidas en cerebro de ratas C, LI, LP y MMI desde E-21 hasta P-32. Se observa como en ratas MMI la cantidad de T3 en cerebro sólo se acerca al valor de C en P-20. Por el contrario en ratas LP, los niveles de T4 son similares a las ratas LI en P-5 y P-10, e incluso en P-5 la T3 de ratas LP es significativamente superior a la que muestran las ratas LI.

\* Diferencia estadísticamente significativa entre ratas C y MMI (gráficas a y c), y entre ratas LI y LP (gráficas b y d). Test de Q,  $P < 0.05$ .

# CEREBRO



**Fig. 9.** Valores medios ( $\pm$  EEM) de las concentraciones de T3 y T4 medidas en cerebro de ratas LP y MMI desde E-21 hasta P-32 expresados en función de las ratas controles (C y LI) que fueron tomadas como el 100 %.

#### **4.2. Comparaciones morfológicas entre grupos controles (C y LI)**

No hubo diferencias (evaluadas mediante análisis de varianza seguido del test de Q) entre las ratas consideradas como controles (ratas C) en los experimentos en los que utilizamos MMI, y entre las ratas tomadas como controles (ratas LI) en los experimentos en los que usamos DPY (con y sin perclorato potásico), ni en el hipocampo, ni en corteza cerebral, ni en el estriado, en los diferentes parámetros inmunocitoquímicos estudiados (RAT-401, GFAP y MBP) según se puede apreciar en las tablas 1, 2, 6, 7 y 8, por lo que a partir de ahora las diferencias estadísticamente significativas de los distintos grupos hipotiroideos (L, LP y MMI) se referirán solamente respecto a las ratas C con objeto de simplificar los resultados obtenidos.

#### **4.3. Número de procesos de glía radial (fibras nestina o GFAP positivas) en edad fetal en el hipocampo de ratas controles (C, LI) e hipotiroideas (L, LP y MMI).**

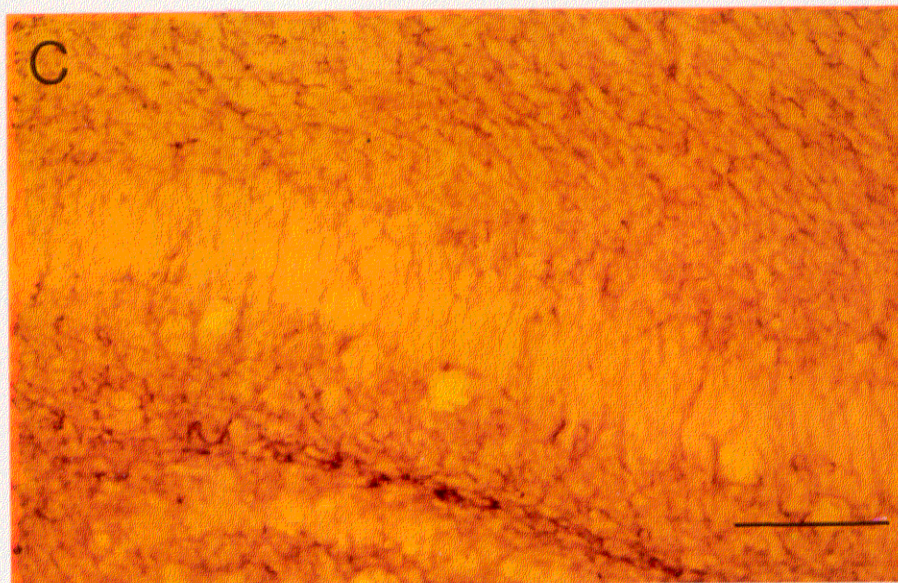
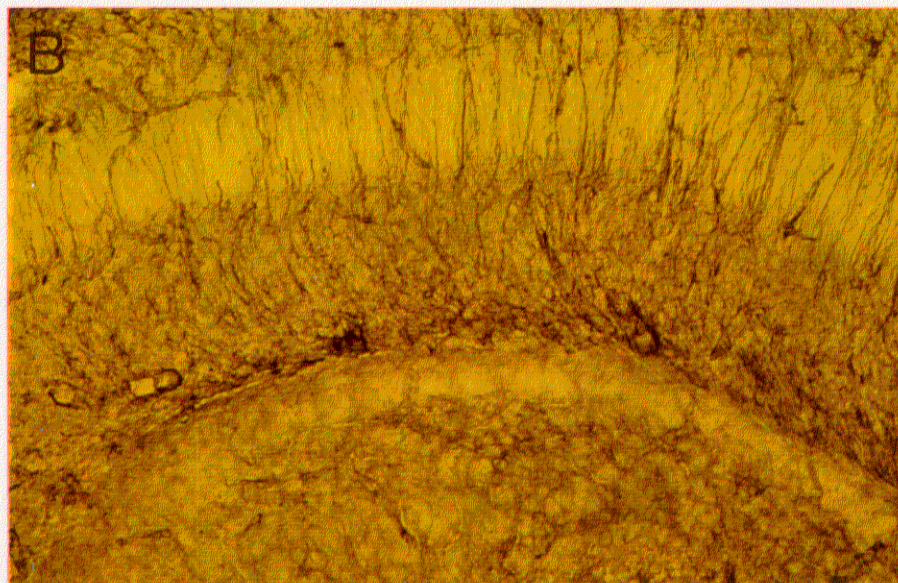
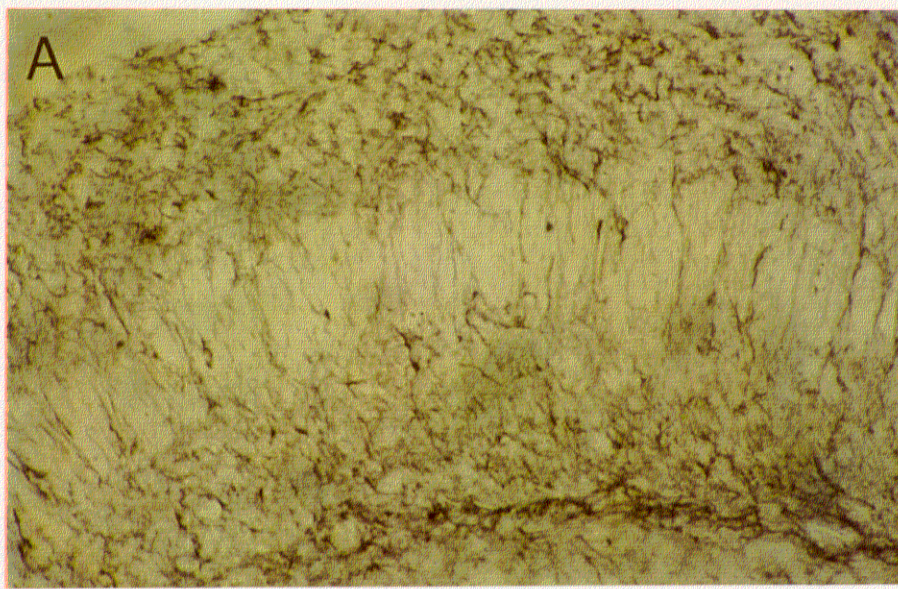
El número de procesos de glía radial “inmadura” identificados inmunocitoquímicamente con el anticuerpo RAT-401, que reconoce la proteína nestina, no fue alterado en E-21 por las condiciones experimentales en las que se ha producido hipotiroidismo (L, LP y MMI). Esto se puede observar en las figuras 10a, 10b y 10c en las que se muestran secciones coronales que contienen el área CA1 del hipocampo y en las cuales no parecen existir diferencias en la inmunoreactividad para RAT-401. Parece por tanto que el número total de fibras gliales “inmaduras” no varía como lo demuestran también los resultados de los contajes realizados en el área CA1 (tabla 1, figura 12), en los que el número medio de fibras gliales que cruzan un segmento de 100  $\mu\text{m}$  es similar en todas las condiciones ( $19.09 \pm 0.41$  en ratas C) excepto en ratas MMI donde es ligeramente más bajo ( $17.53 \pm 0.43$ ).

Por el contrario el número de procesos de glía radial “madura”, que empiezan a expresar GFAP, sí se ve disminuido en las distintas situaciones de déficit de HT (L, LP, y MMI) con respecto a C. Como podemos ver en las figuras 11a, 11b y 11c el marcaje que obtenemos con el anticuerpo contra la GFAP es menos intenso para las ratas LP, y menos aún para las ratas MMI. Esto se ha comprobado cuantitativamente (tabla 2, figura 12) en el área CA1 obteniendo un descenso estadísticamente significativo del número de procesos GFAP inmunoreactivos (test de Q,  $P < 0.001$ ) respecto a ratas C ( $8.69 \pm 0.29$ ), en ratas L ( $5.85 \pm 0.39$ ), LP ( $6.32 \pm 0.36$ ) y MMI ( $4.75 \pm 0.30$ ).

#### **4.4. Número de procesos de glía radial (fibras nestina o GFAP positivas) en edad fetal y neonatal en la corteza cerebral de ratas controles (C, LI) e hipotiroideas (L, LP, MMI)**

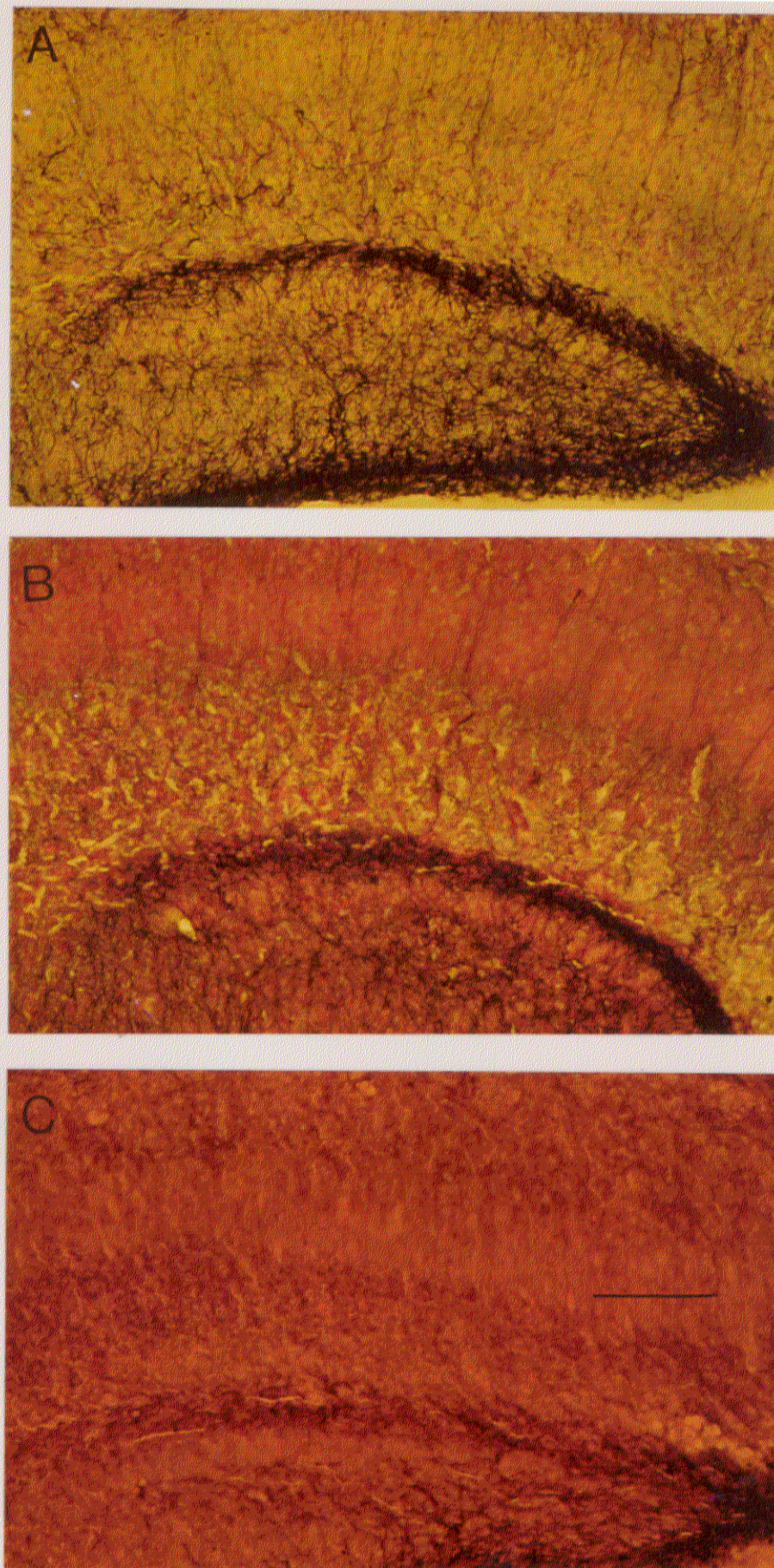
En E-21, el número de procesos de glía radial “inmadura” identificados con el anticuerpo RAT-401 (tabla 1, figuras 13 y 14) no varía en el área visual de la corteza cerebral en ninguna de las dos zonas estudiadas (corteza superficial y corteza profunda) en las ratas L y LP con respecto a las ratas C. Es muy significativo por otra parte el descenso de fibras gliales inmunoreactivas para el anticuerpo RAT-401 (test de Q,  $P < 0.001$ ) en ratas MMI tanto en corteza superficial ( $5.61 \pm 0.64$  de MMI frente a  $18.45 \pm 0.97$  de C) como en corteza profunda ( $8.05 \pm 0.73$  de MMI frente a  $17.54 \pm 1.01$  de C) lo que indica que parece haber un efecto distinto en la corteza cerebral dependiendo si el hipotiroidismo es inducido por el bociógeno (ratas MMI) o por déficit de yodo (ratas L y LP). En las figuras 13a, 13b y 13c podemos observar glía radial marcada con RAT-401 en ratas C, LP y MMI respectivamente. La rata C presenta una densa red de fibras radiales perpendiculares a la pia por donde se supone migran las neuronas que han terminado su última mitosis (Rakic, 1972 y 1981; Caviness, 1989), la rata LP también parece conservar esa red glial, pero la rata MMI conserva muchos menos procesos gliales, sobre todo en corteza superficial, de acuerdo con los resultados obtenidos mediante los





**Fig. 10.** Microfotografías de secciones de 50  $\mu\text{m}$  de espesor del área CA1 de hipocampo de ratas E-21, procesadas por inmunocitoquímica utilizando el anticuerpo RAT-401 y en las que se pueden observar fibras de glia radial. A, ratas controles; B, ratas mantenidas a dieta pobre en yodo con perclorato potásico; C, ratas tratadas con MMI en el agua de bebida. La barra horizontal indica 100  $\mu\text{m}$  de longitud.





**Fig. 11.** Microfotografías de secciones de 50  $\mu\text{m}$  de espesor del área CA1 de hipocampo de ratas E-21, procesadas inmunocitoquímicamente y en las que se pueden observar fibras de glia radial inmunoreactivas para GFAP. A, ratas controles; B, ratas mantenidas a dieta pobre en yodo con perclorato potásico; C, ratas tratadas con MMI en el agua de bebida. La barra horizontal indica 100  $\mu\text{m}$  de longitud.



**Tabla 1:** valores medios ( $\pm$  EEM) del número de procesos de glia radial “inmadura” marcados con el anticuerpo RAT-401 (medidos en cortes de 50  $\mu$ m de espesor) que cruzan un segmento de 100  $\mu$ m situado en el área CA1 de hipocampo (en E-21) o bien en la zona superficial y en la zona profunda del área visual de la corteza cerebral (en E-21, P-5 y P-10).

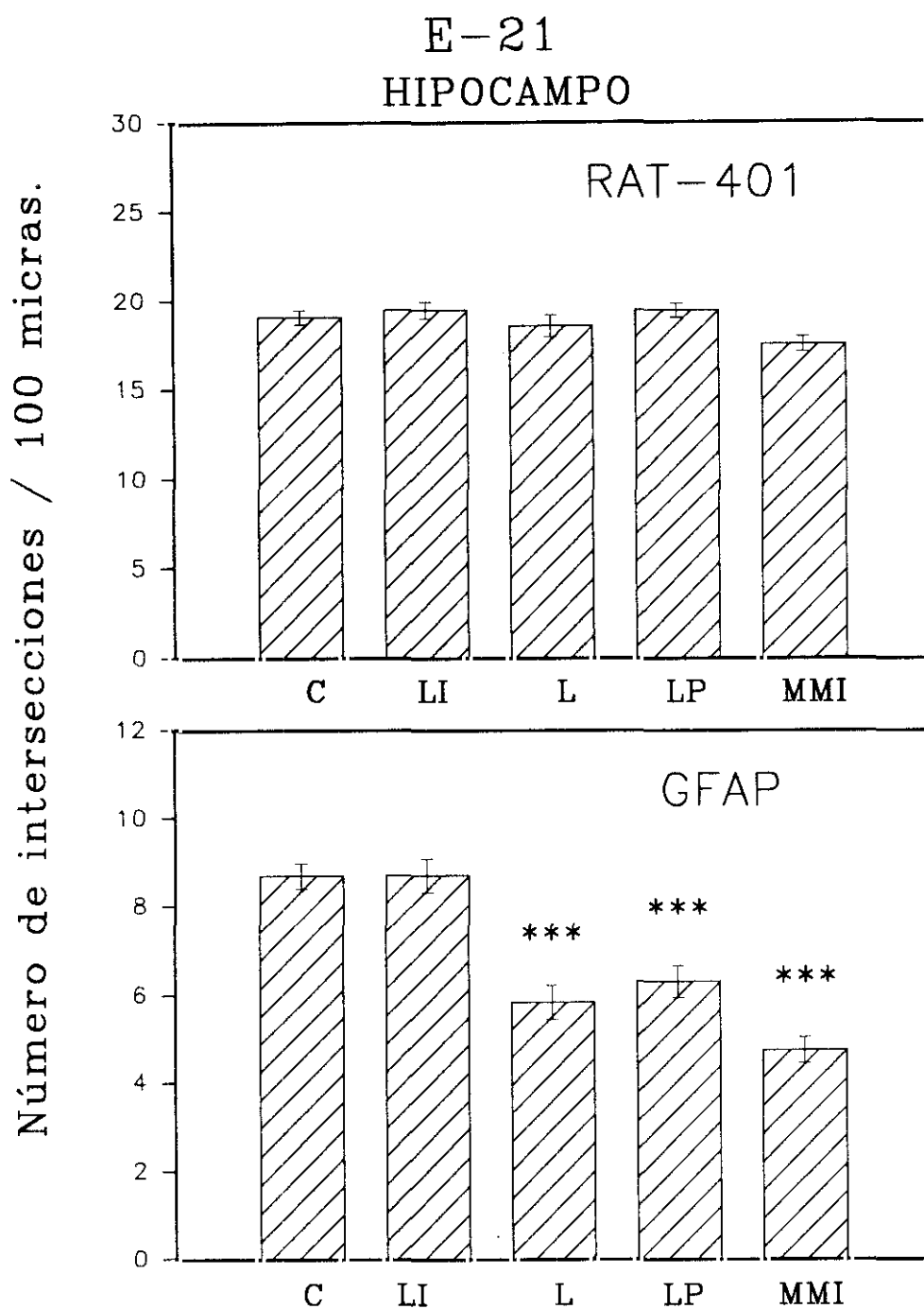
RAT-401						
		C	LI	L	LP	MMI
E-21	HIPOCAMPO CA1	19.09 $\pm$ 0.41	19.49 $\pm$ 0.49	18.59 $\pm$ 0.62	19.46 $\pm$ 0.42	17.53 $\pm$ 0.43
	CORTEZA SUPERFICIAL	18.45 $\pm$ 0.97	16.37 $\pm$ 0.88	17.58 $\pm$ 0.67	16.78 $\pm$ 0.93	5.61 $\pm$ 0.64 P < 0.001
	CORTEZA PROFUNDA	17.54 $\pm$ 1.01	15.52 $\pm$ 1.00	17.08 $\pm$ 0.79	16.05 $\pm$ 0.83	8.05 $\pm$ 0.73 P < 0.001
P-5	CORTEZA SUPERFICIAL	22.55 $\pm$ 0.74	24.22 $\pm$ 0.84		22.94 $\pm$ 0.99	23.28 $\pm$ 0.76
	CORTEZA PROFUNDA	22.88 $\pm$ 0.53	23.16 $\pm$ 1.07		22.81 $\pm$ 0.91	21.52 $\pm$ 0.83
P-10	CORTEZA SUPERFICIAL	5.41 $\pm$ 0.41	4.50 $\pm$ 0.37		5.44 $\pm$ 0.51	13.00 $\pm$ 0.56 P < 0.001
	CORTEZA PROFUNDA	5.12 $\pm$ 0.70	4.91 $\pm$ 0.52		6.38 $\pm$ 0.54	10.12 $\pm$ 0.86 P < 0.001

*Se indican las diferencias estadísticamente significativas respecto a ratas C, test de Q.*

**Tabla 2:** valores medios ( $\pm$  EEM) del número de procesos de glia radial “madura” marcados con el anticuerpo anti-GFAP (medidos en cortes de 50  $\mu$ m de espesor) que cruzan un segmento de 100  $\mu$ m situado en el área CA1 de hipocampo (en E-21) o bien en la zona superficial y en la zona profunda del área visual de la corteza cerebral (en P-5).

GFAP						
		C	LI	L	LP	MMI
E-21	HIPOCAMPO CA1	8.69 $\pm$ 0.29	8.71 $\pm$ 0.39	5.85 $\pm$ 0.39 P < 0.001	6.32 $\pm$ 0.36 P < 0.001	4.75 $\pm$ 0.30 P < 0.001
P-5	CORTEZA SUPERFICIAL	11.40 $\pm$ 0.60	11.05 $\pm$ 1.07		12.38 $\pm$ 0.97	12.65 $\pm$ 0.53
	CORTEZA PROFUNDA	14.58 $\pm$ 0.65	15.61 $\pm$ 0.74		14.77 $\pm$ 0.97	8.04 $\pm$ 0.79 P < 0.001

*Se indican las diferencias estadísticamente significativas respecto a ratas C, test de Q.*



**Fig. 12.** Valor medio ( $\pm$  EEM) del número de fibras de glia radial “madura” marcadas con GFAP (gráfica superior) e “inmadura” marcadas con RAT-401 (gráfica inferior) cuantificado en el área CA1 del hipocampo de ratas C, LI, L, LP y MMI en fetos de 21 días.

\*\*\* Diferencia estadísticamente significativa con respecto a C. Test de Q,  $P < 0.001$ .

contajes, ya que como hemos visto anteriormente las ratas MMI presentan más fibras en corteza profunda ( $8.05 \pm 0.73$ ) que en corteza superficial ( $5.61 \pm 0.64$ ). No hubo por el contrario apenas fibras inmunopositivas para GFAP en el área visual en ninguna de las condiciones estudiadas (resultados no mostrados) por lo que se consideró que no se iba a llevar a cabo la cuantificación de procesos de glía radial “madura” en corteza cerebral en E-21.

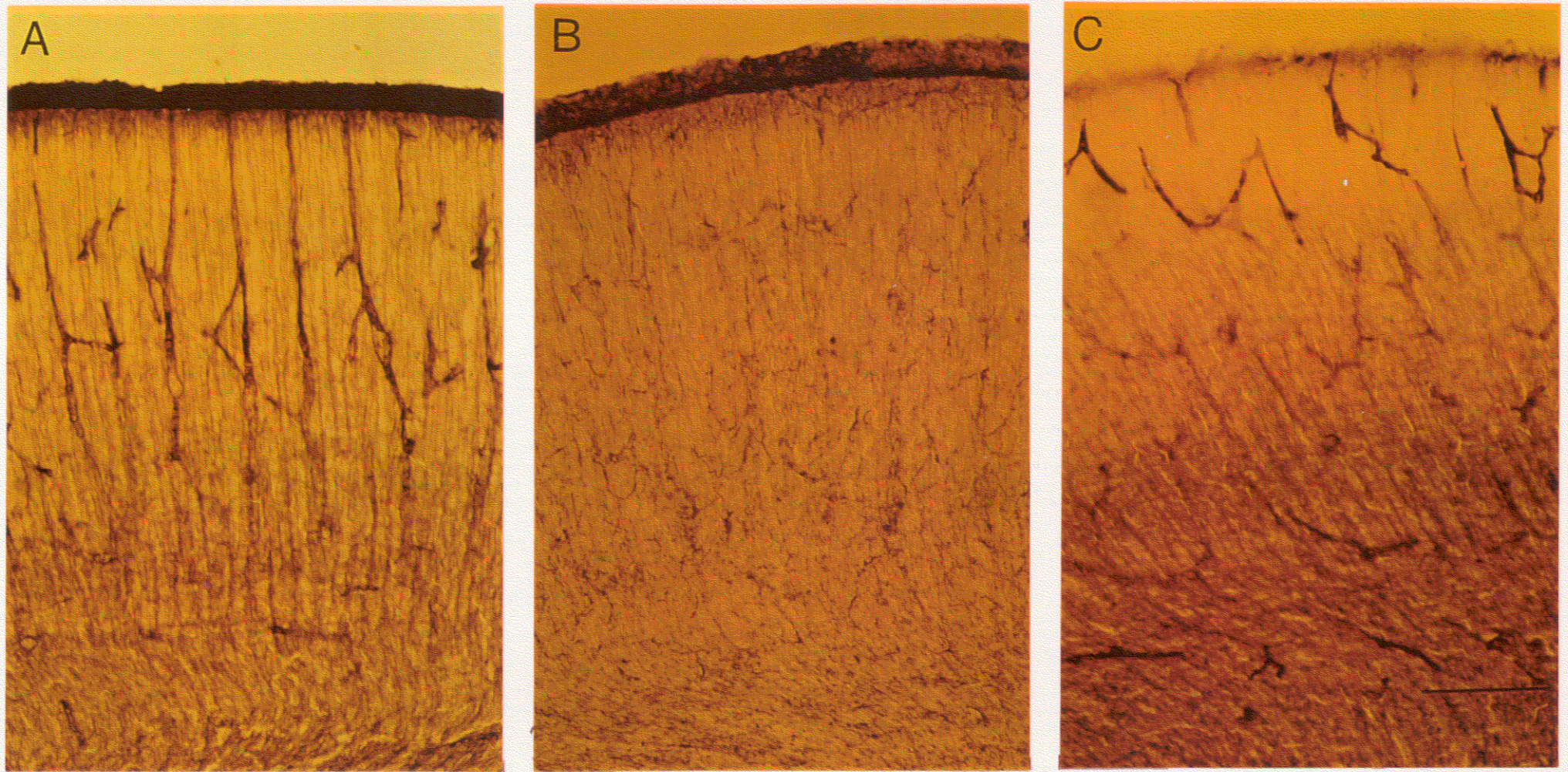
Los resultados en E-21 obtenidos en hipocampo (con RAT-401 y GFAP) y corteza cerebral (con RAT-401) en los que no encontramos diferencia significativas entre ratas L y ratas LP (tablas 1 y 2) nos llevaron, con el propósito de simplificar los experimentos que se iban a realizar a partir de entonces, a suprimir la condición experimental L (como se indica en apartado 3.3.2)

En P-5 no hubo diferencias en los procesos de glía radial “inmadura” marcados con RAT-401 en ninguna de las condiciones estudiadas (tabla 1, figuras 14, 15a, 15b y 15c). El número de procesos parece aumentar ligeramente con respecto a E-21 tanto en corteza superficial como en corteza profunda. En ratas C por ejemplo hay en corteza superficial  $22.55 \pm 1.01$  procesos / 100  $\mu\text{m}$  frente a los  $18.45 \pm 0.97$  procesos existentes en E-21 y en corteza profunda se alcanzan  $22.88 \pm 0.53$  procesos en P-5 frente a los  $17.54 \pm 1.01$  obtenidos en E-21. El número de procesos de glía radial “madura” (tabla 2, figuras 16a, 16b, 16c, y 17) GFAP-positivos sí presenta diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) aunque solamente en corteza profunda en las ratas MMI ( $8.04 \pm 0.79$ ) con respecto a las ratas C ( $14.58 \pm 0.65$ ). En la figura 16a se muestra la corteza profunda de una rata C con abundantes fibras que expresan GFAP y también observamos en la figura 16b que la rata LP expresa GFAP en cantidad similar a la rata C. En la figura 16c vemos por el contrario que las fibras gliales que expresan GFAP son mucho más escasas lo que nos recuerda a la situación que encontramos en el área CA1 de hipocampo en E-21.

Las alteraciones observadas en la corteza cerebral en E-21 y P-5 en ratas MMI que parecen indicar un retraso en la formación y desarrollo de la glía radial en el área visual (ya que el número de fibras de glía radial “inmadura” marcadas con RAT-401 es mucho

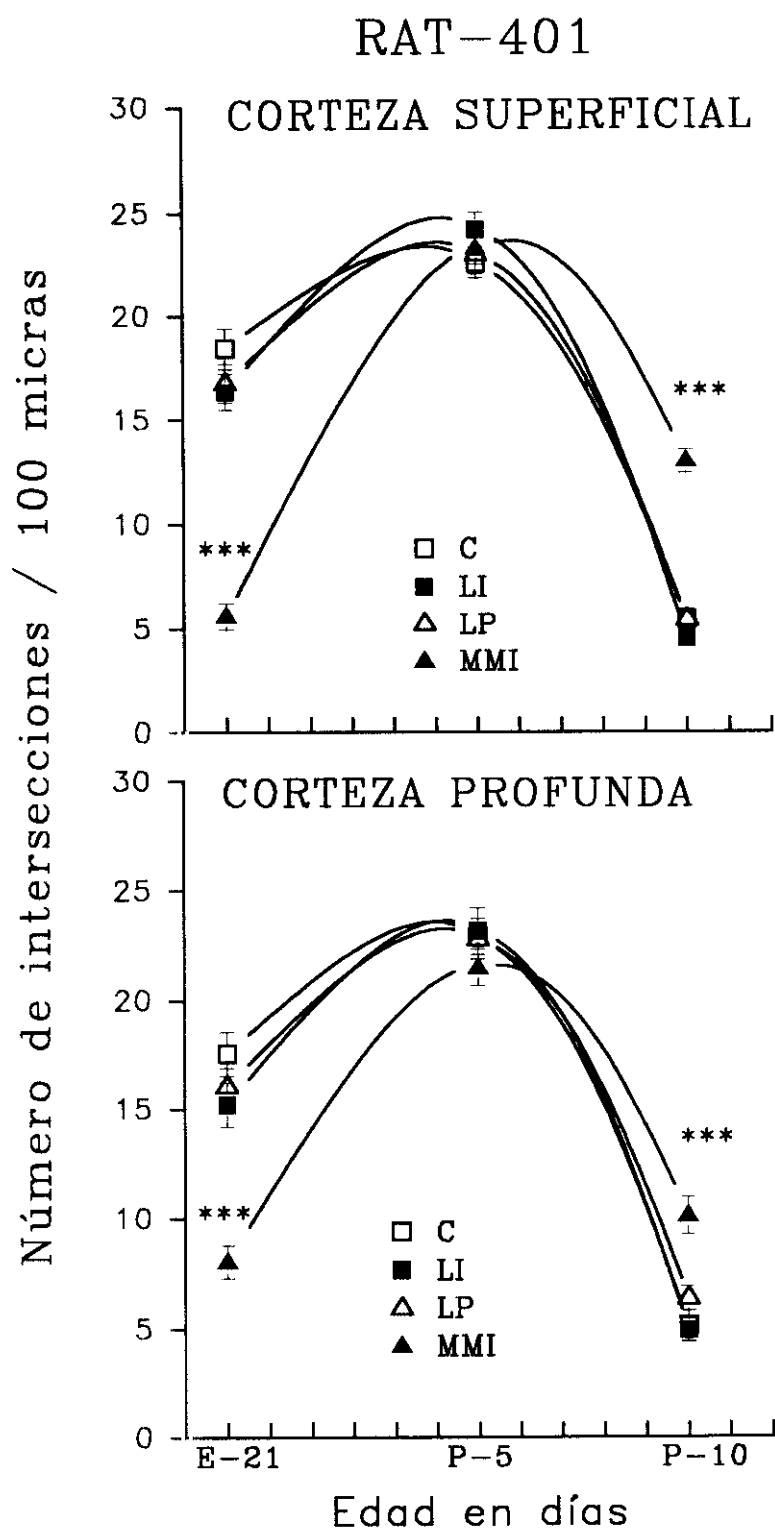
menor en E-21 en ratas MMI que en C tanto en corteza superficial como en profunda) y también un retraso en la expresión de marcadores gliales más tardíos (como lo indica en P-5 la disminución en la expresión de GFAP en corteza profunda) pueden conducir a un retraso en la desaparición de dicha red glial una vez que la migración neuronal ha sido completada. Esto parece confirmarse con los resultados obtenidos en P-10 (tabla 2, figuras 14, 18a, 18b y 18c) donde el número de fibras marcadas con RAT-401 es significativamente mayor ( $P < 0.001$ ) tanto en corteza superficial ( $13 \pm 0.56$  en ratas MMI frente a  $5.41 \pm 0.41$  en ratas C) como en corteza profunda ( $10.12 \pm 0.86$  en ratas MMI frente a  $5.12 \pm 0.70$  en ratas C). Las figuras 18a y 18b que pertenecen a cortes en los que aparece zona profunda de ratas C y ratas LP respectivamente, y muestran que la cantidad de glía radial ha disminuido considerablemente respecto a P-5, se observan además abundantes varicosidades que interpretamos como acúmulos proteicos posiblemente de proteínas constituyentes de filamentos intermedios (nestina, vimentina, etc) que reflejan un deterioro de los procesos gliales que formaban el “andamiaje” por el cual las neuronas han conseguido alcanzar sus posiciones definitivas. En la figura 18c perteneciente a una rata MMI se observa un mayor número de fibras gliales y una menor cantidad de varicosidades, aunque sí es posible ver astrocitos inmunoreactivos para RAT-401.





**Fig. 13.** Microfotografías de secciones de 50  $\mu\text{m}$  de espesor del área visual de la corteza cerebral de ratas E-21, en las que se pueden observar fibras de glia radial inmunoreactiva para el anticuerpo RAT-401. A, ratas controles; B, ratas mantenidas a dieta pobre en yodo con perclorato potásico; C, ratas tratadas con MMI en el agua de bebida. La barra horizontal indica 100  $\mu\text{m}$  de longitud.





**Fig. 14.** Valores medios ( $\pm$  EEM) del número de fibras de glia radial marcadas con RAT-401 cuantificado en la zona superficial (gráfica superior) y en la zona profunda (gráfica inferior) en el área visual de la corteza cerebral de ratas C, LI, LP y MMI desde E-21 hasta P-10.

\*\*\* Diferencia estadísticamente significativa con respecto a C. Test de Q,  $P < 0.001$ .



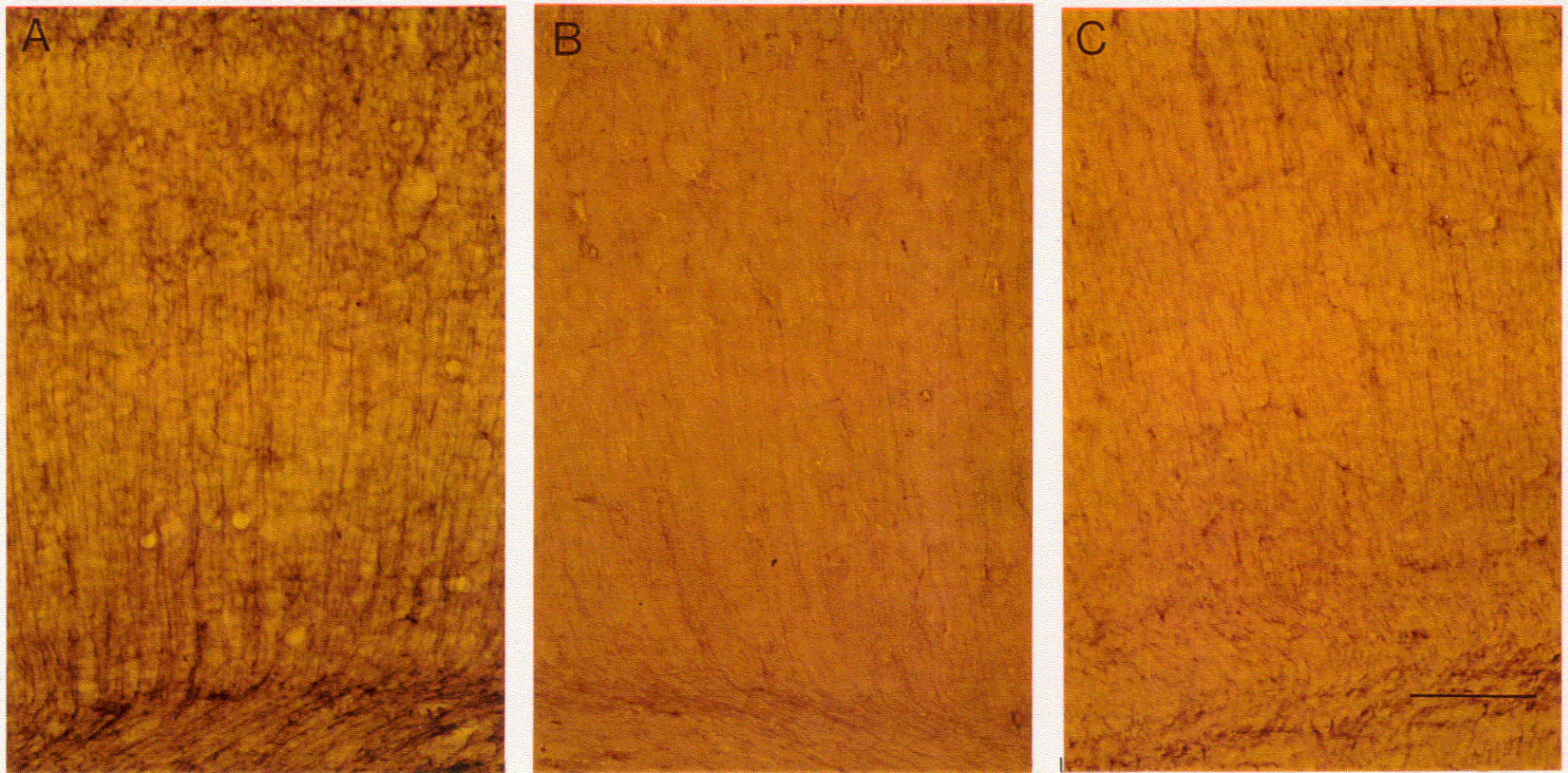
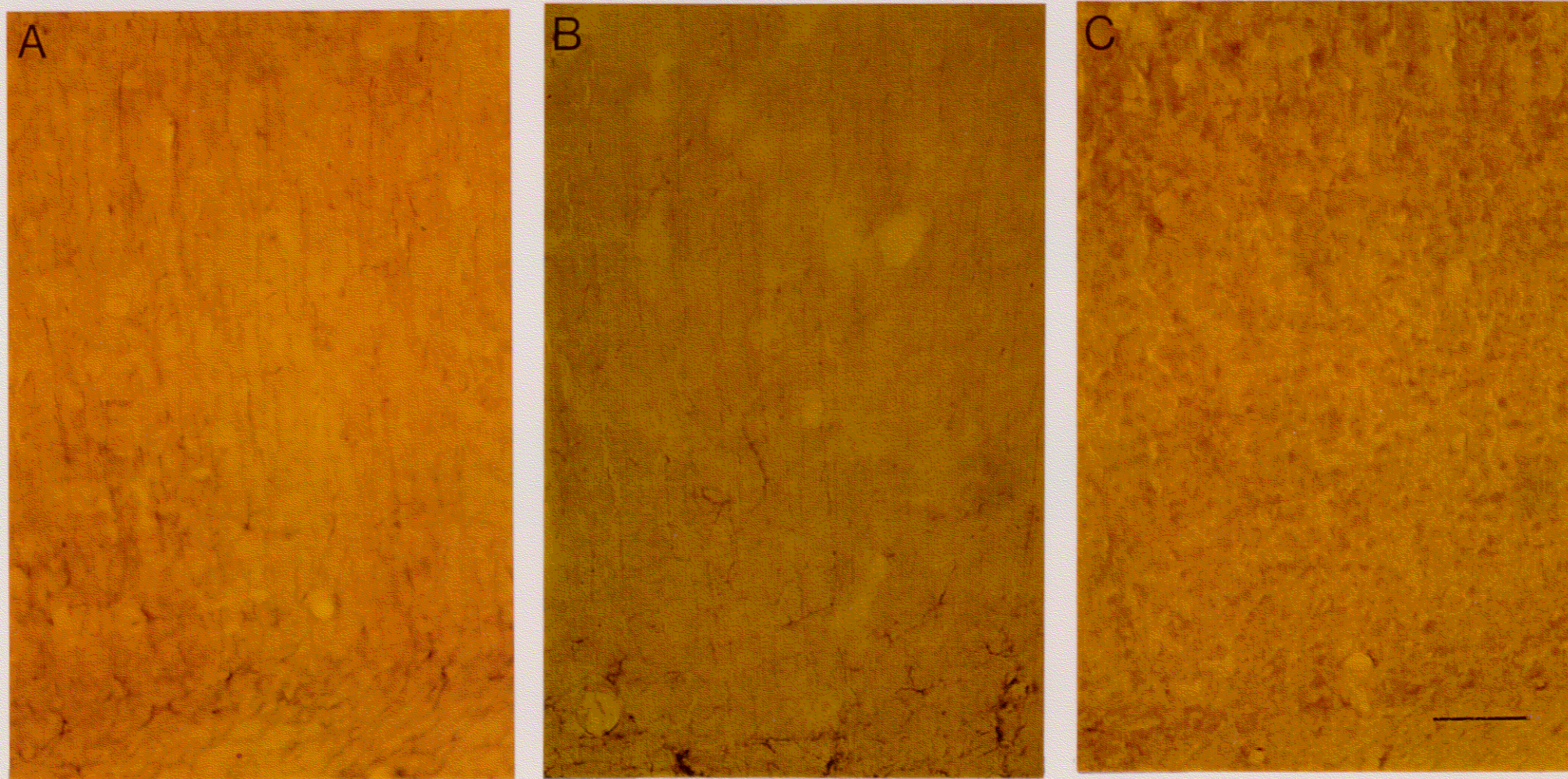


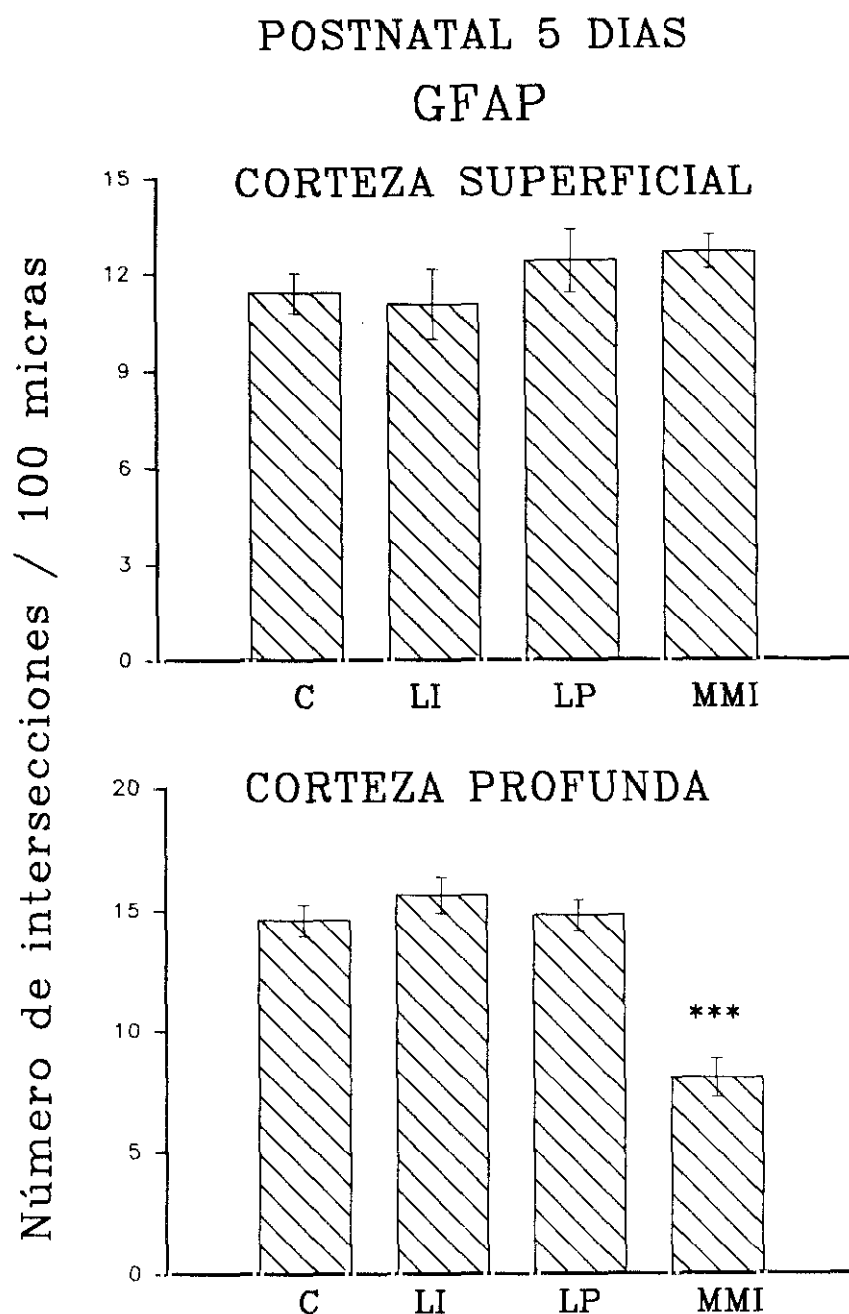
Fig. 15. Microfotografías de secciones de  $50\ \mu\text{m}$  de espesor del área visual de la corteza cerebral de ratas P-5, en las que se pueden observar fibras de glia radial inmunoreactiva para el anticuerpo RAT-401. A, ratas controles; B, ratas mantenidas a dieta pobre en yodo con perclorato potásico; C, ratas tratadas con MMI en el agua de bebida. La barra horizontal indica  $100\ \mu\text{m}$  de longitud.





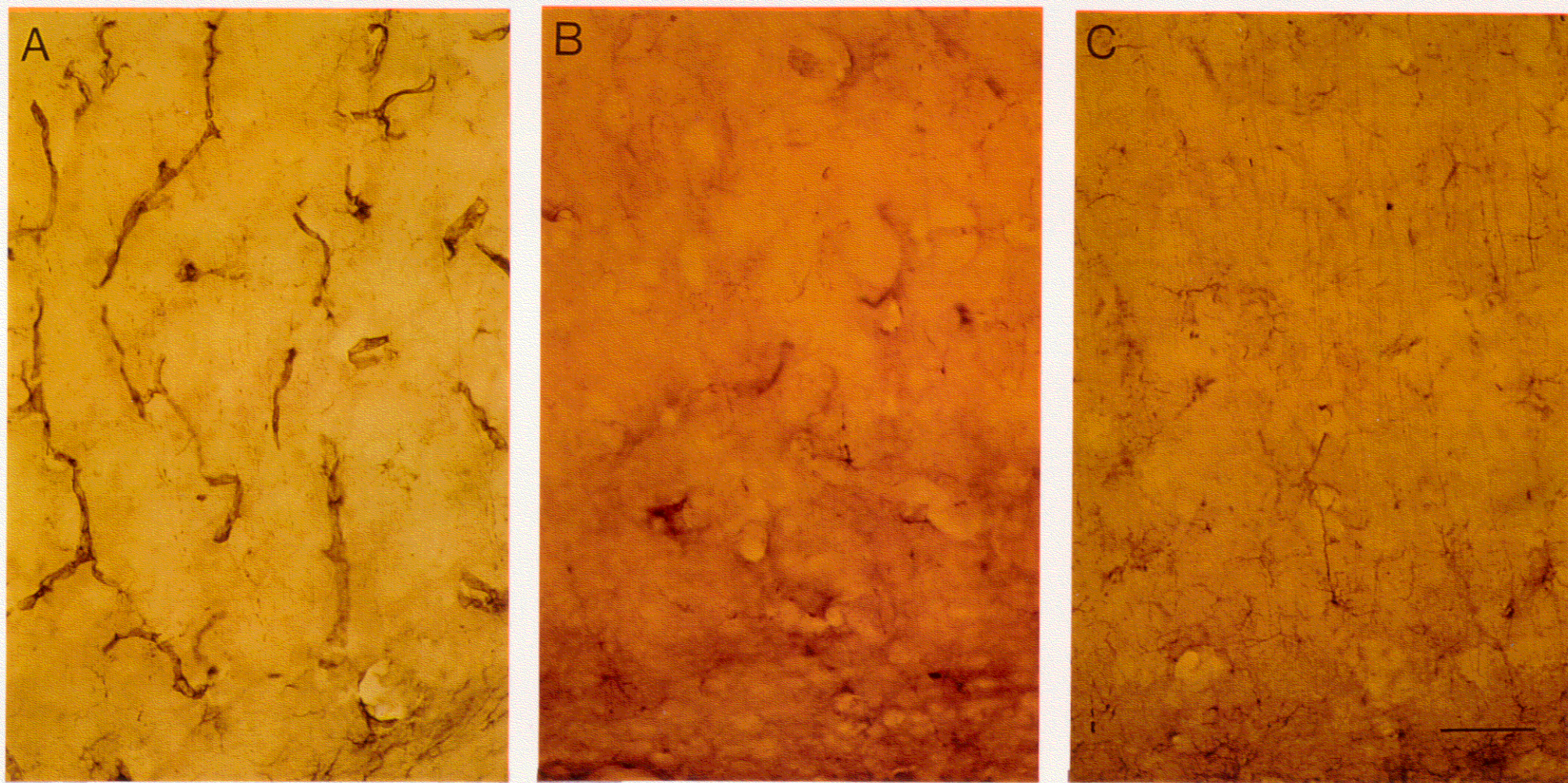
**Fig. 16.** Microfotografías de secciones de 50  $\mu\text{m}$  de espesor del área visual de la corteza cerebral de ratas P-5, en las que se pueden observar fibras de glia radial inmunoreactiva para GFAP. A, ratas controles; B, ratas mantenidas a dieta pobre en yodo con perclorato potásico; C, ratas tratadas con MMI en el agua de bebida. La barra horizontal indica 50  $\mu\text{m}$  de longitud.





**Fig. 17.** Valor medio ( $\pm$  EEM) del número de fibras de glía radial que expresan GFAP cuantificado en la zona superficial (gráfica superior) y en la zona profunda (gráfica inferior) en el área visual de la corteza cerebral de ratas C, LI, LP y MMI en postnatales de 5 días.  
\*\*\* Diferencia estadísticamente significativa con respecto a C. Test de Q,  $P < 0.001$ .





**Fig. 18.** Microfotografías de secciones de 50  $\mu\text{m}$  de espesor del área visual de la corteza cerebral de ratas P-10, en las que se pueden observar fibras de glia radial inmunoreactiva para el anticuerpo RAT-401. A, ratas controles; B, ratas mantenidas a dieta pobre en yodo con perclorato potásico; C, ratas tratadas con MMI en el agua de bebida. La barra horizontal indica 50  $\mu\text{m}$  de longitud.

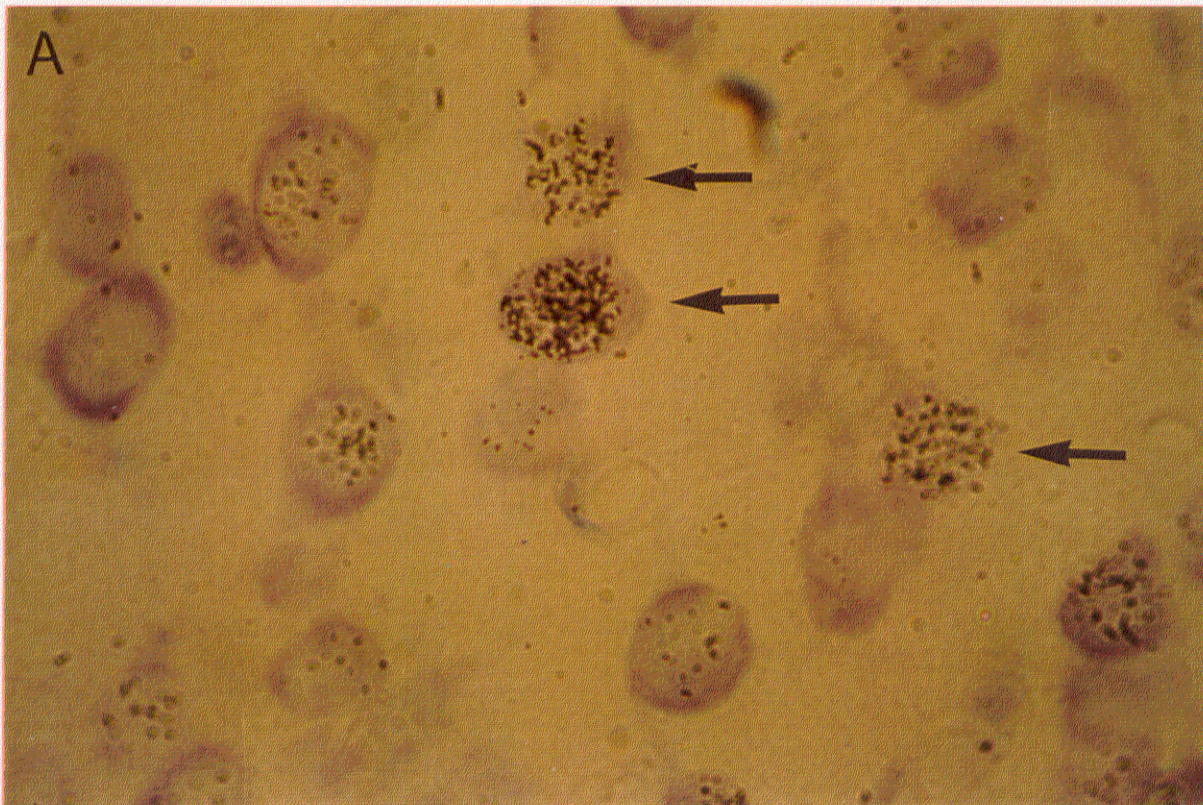


#### **4.5. Efectos de la carencia de yodo en la neurogénesis en corteza cerebral. Formación de capas corticales en el área visual de ratas controles (LI) e hipotiroideas (LP)**

Se siguió el criterio de considerar como positivas sólo las neuronas intensamente marcadas como se describe en material y métodos (apartado 3.5.3); en la figura 19a tenemos un ejemplo de neuronas fuertemente marcadas consideradas como positivas, y en la figura 19b se muestran varias neuronas con poco marcaje y que han pasado por sucesivas mitosis tras la inyección de timidina tritiada, por lo que tienen una cantidad menor de granos de plata sobre su superficie que aquellas fuertemente marcadas y que incorporaron la timidina tritiada durante su última división. Antes de analizar cuantitativamente los resultados, se procedió a la observación al microscopio de los cortes para comprobar si con estas inyecciones en E-16 y en E-17 habíamos conseguido marcar preferentemente las neuronas de la capa V. Se observó que tras la inyección en E-16, las capas marcadas preferentemente eran la V y la VI: en la figura 20 se muestra una imagen principalmente de las capas V y VI en una rata LI (figura 20a) y otra LP (figura 20b) cuyas madres fueron inyectadas con timidina tritiada en E-16. El marcaje más abundante tras la inyección realizada en E-17 fue encontrado de forma mayoritaria en las capas IV y V: en la figura 21 se muestran principalmente de las capas IV y V en una rata LI (figura 21a) y otra LP (figura 21b) cuyas madres fueron inyectadas con timidina tritiada en E-17. Posteriormente la cuantificación nos confirmó parte de nuestras observaciones y nos permitió especificar en que capas corticales teníamos el mayor número de neuronas marcadas dependiendo de la edad de inyección y de la condición experimental.

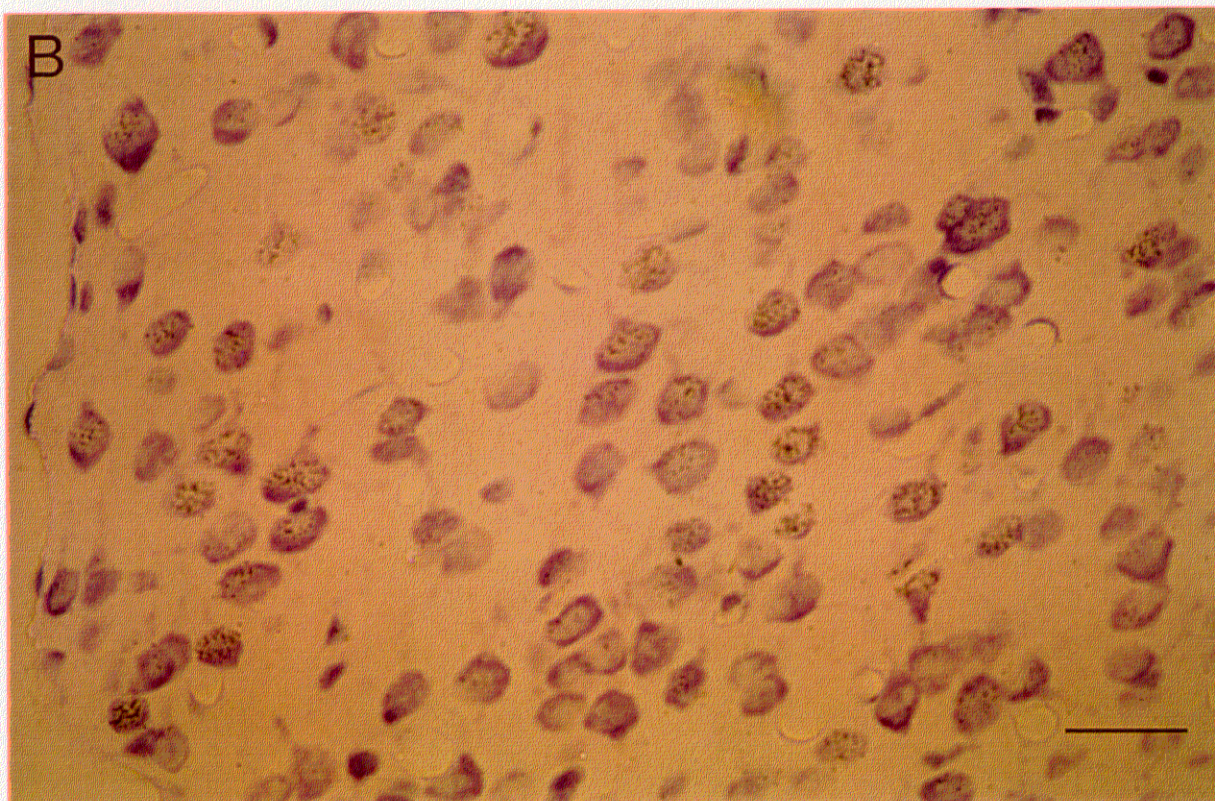
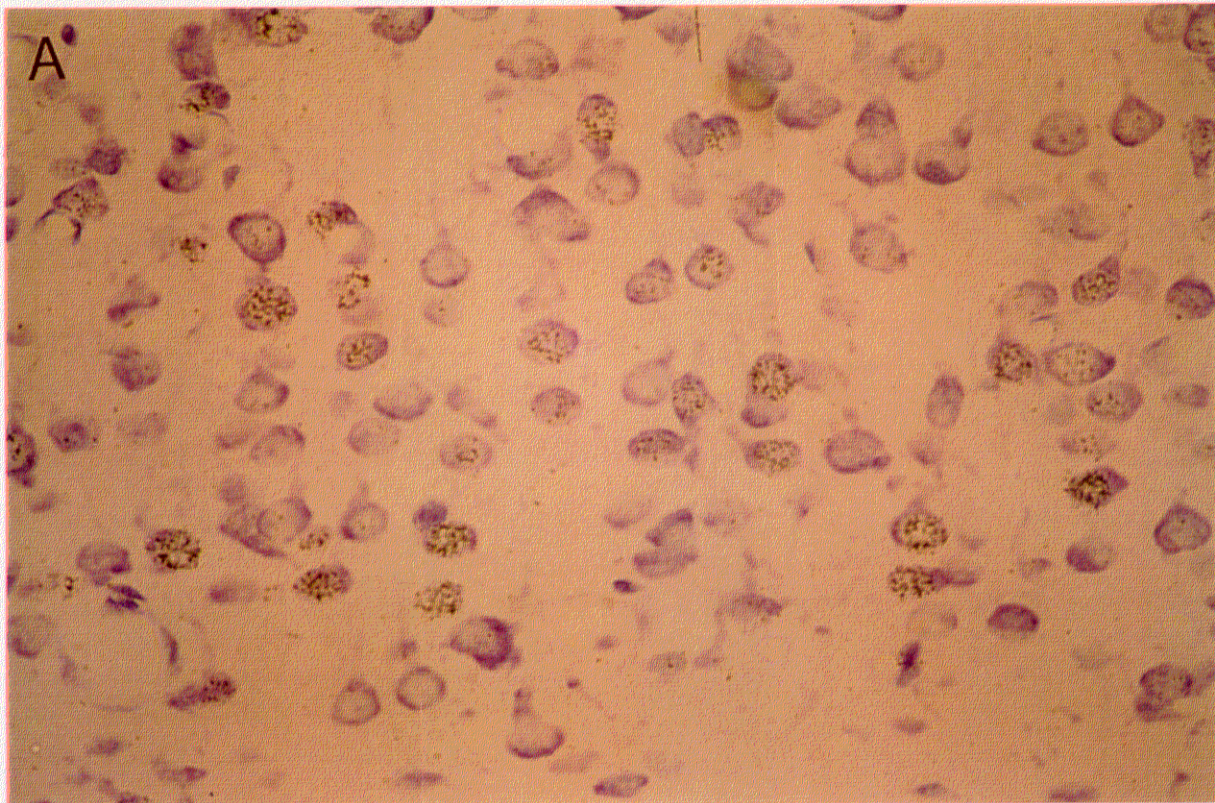
En la figura 22 se muestran dos gráficas en las que está representado el número de neuronas marcadas contenidas en la sonda de prueba como se describe en material y métodos (apartado 3.5.3.), en ambas condiciones experimentales, tras inyección en E-16 y en E-17. Se puede observar que si inyectamos en E-16 el grupo de ratas LP tiene mayor número de neuronas marcadas en la capa II/III respecto a las ratas LI, el mismo número en capas IV y V y muchas menos neuronas marcadas en la VI que las ratas LI. Si la





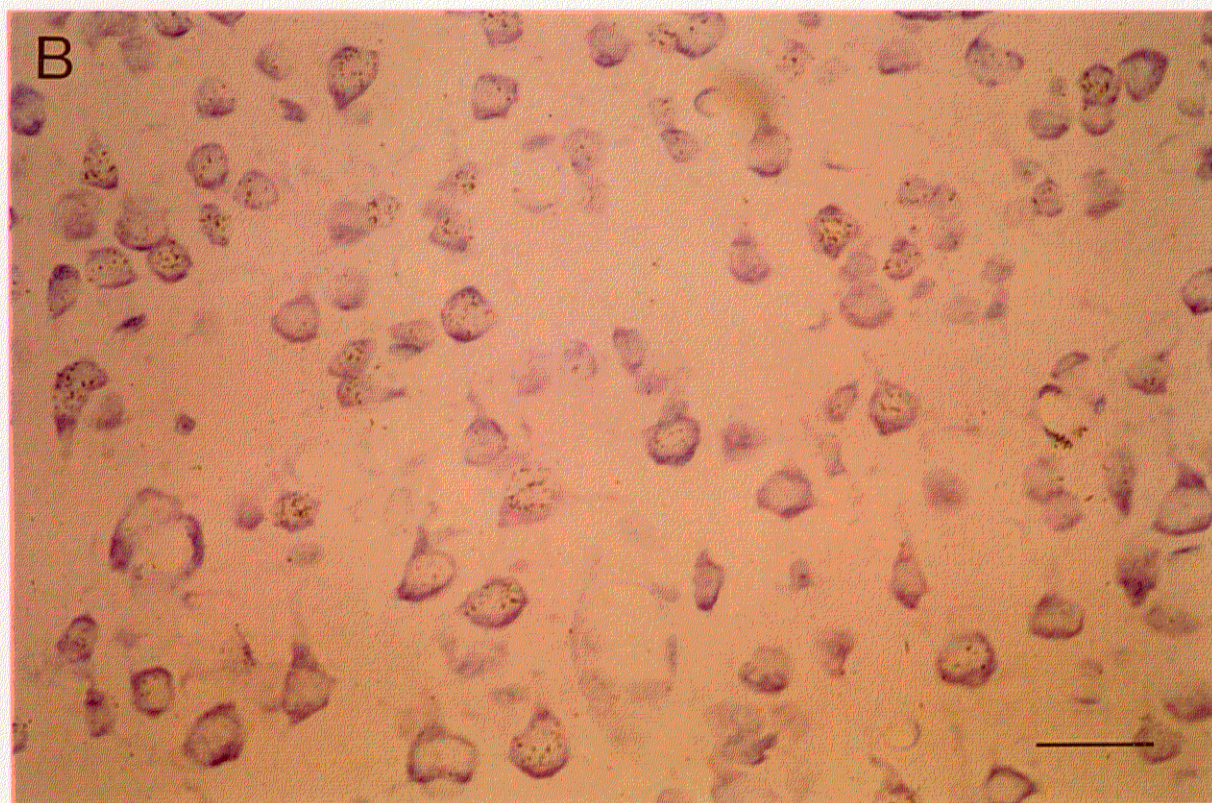
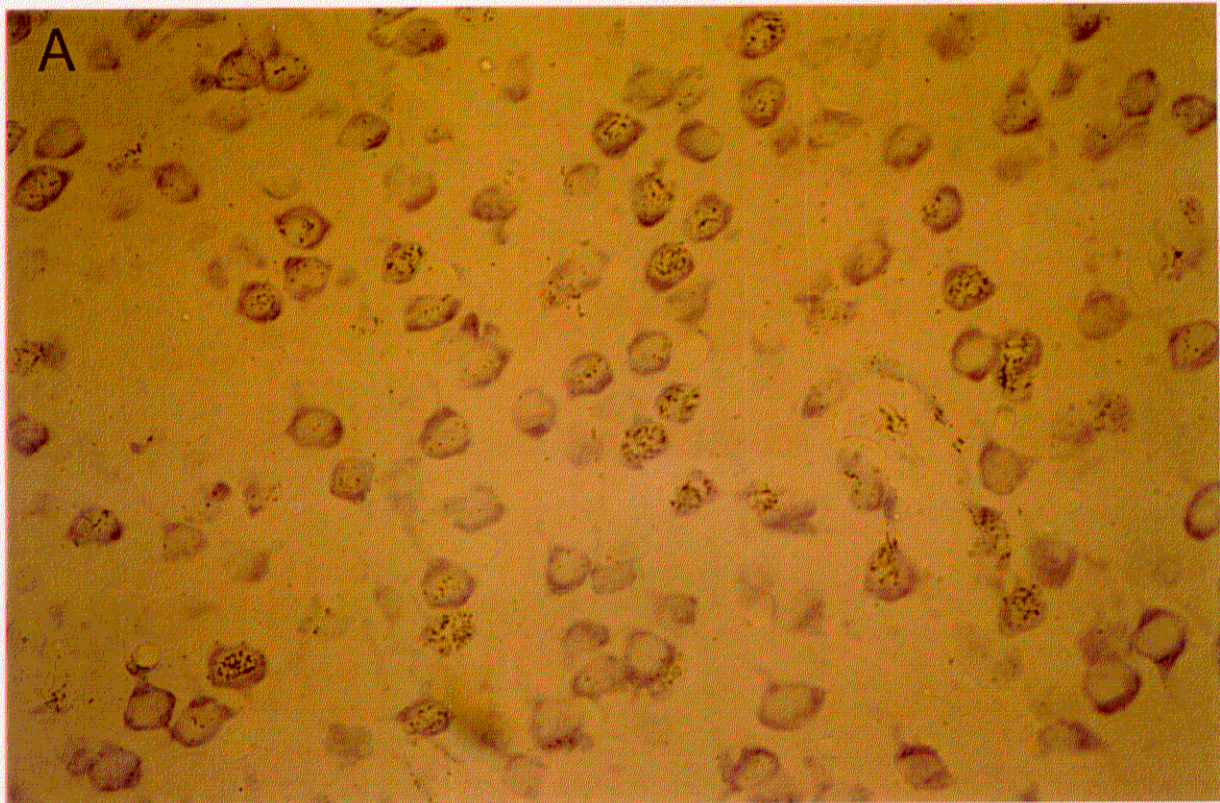
**Fig. 19.** Microfotografías de secciones de 7  $\mu\text{m}$  de espesor del área visual de la corteza cerebral de una rata P-22 y cuya madre recibió una inyección de timidina tritiada el día 16 de gestación. Las flechas grandes en A muestran ejemplos de neuronas fuertemente marcadas y que fueron consideradas como positivas. Las flechas pequeñas en B muestran neuronas débilmente marcadas que se han dividido varias veces después de la inyección de timidina tritiada. La barra horizontal indica 10  $\mu\text{m}$  de longitud.





**Fig. 20.** Microfotografías de secciones de 7  $\mu\text{m}$  de espesor del área visual de la corteza cerebral de ratas P-22 y cuyas madres recibieron una inyección de timidina tritiada el día 16 de gestación. A, ratas mantenidas a dieta pobre en yodo suplementada con yoduro potásico; B, ratas mantenidas a dieta pobre en yodo con perclorato potásico. La barra horizontal indica 25  $\mu\text{m}$  de longitud.

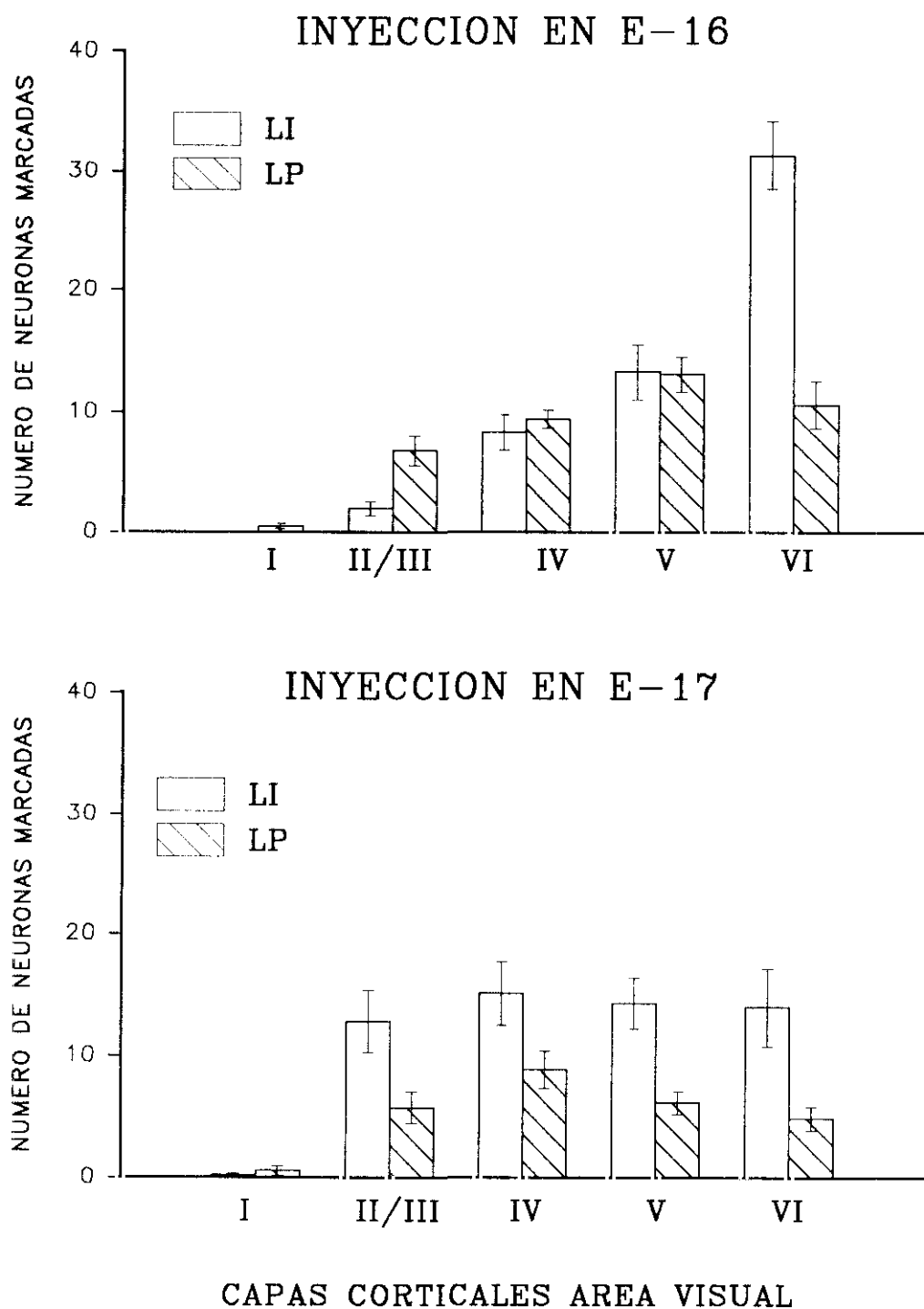




**Fig. 21.** Microfotografías de secciones de 7  $\mu\text{m}$  de espesor del área visual de la corteza cerebral de ratas P-22 y cuyas madres recibieron una inyección de timidina tritiada el día 17 de gestación. A, ratas mantenidas a dieta pobre en yodo suplementada con yoduro potásico; B, ratas mantenidas a dieta pobre en yodo con perclorato potásico. La barra horizontal indica 25  $\mu\text{m}$  de longitud.



## TIMIDINA TRITIADA



**Fig. 22.** Valor medio ( $\pm$  EEM) del número de neuronas marcadas con timidina tritiada en cada capa cortical contenidas en una sonda de prueba (como se describe en material y métodos) en ratas LI y LP de 22 días de edad postnatal y cuyas madres recibieron una inyección de timidina tritiada los días 16 (gráfica superior) y 17 (gráfica inferior) de gestación.

inyección se realiza en E-17 la reducción en el número de neuronas marcadas en ratas LP con respecto a LI se produce en capas II/III, IV, V y VI. Ante estos resultados existía la posibilidad de que el hipotiroidismo inducido por las dietas LP hubiera provocado una disminución en el número de neuronas presentes en la corteza cerebral y por tanto al existir menor número de neuronas totales nosotros cuantificáramos menos neuronas marcadas en estas ratas LP. Este fue el motivo para que posteriormente cuantificáramos por una parte el número de neuronas totales (neuronas marcadas radiactivamente y neuronas sin marcar, teñidas todas ellas con tionina ácida por el método de Nissl) contenidas en nuestra sonda, y por otra parte el tanto por ciento de neuronas marcadas con respecto al número de neuronas totales. En las tablas 3 y 4 se muestra el número de neuronas radiactivamente marcadas, número de neuronas totales y tanto por ciento de neuronas marcadas, tanto en ratas LI como en ratas LP, en P-22 y tras inyección en E-16 (tabla 3) y E-17 (tabla 4) contenidas en la sonda de prueba. En la tabla 5 y en la parte superior de la figura 23, tenemos representado el número de neuronas /  $100 \mu\text{m}^2$  en cada capa cortical en P-22 en ratas LI y LP. Para realizar este estudio se promedió el número de neuronas totales por capa de los animales inyectados en E-16 y E-17 en cada una de las dos condiciones experimentales, ya que la edad de sacrificio fue siempre en P-22. No encontramos diferencias en el número de neuronas /  $100 \mu\text{m}^2$  en cada capa cortical entre las dos condiciones estudiadas lo que coincide con otros autores (Benham-Rassoli y col., 1991) los cuales induciendo hipotiroidismo con PTU y utilizando métodos estereológicos tampoco observan ninguna variación en el número de neuronas en corteza cerebral de ratas tratadas con PTU respecto a ratas controles. En la parte inferior de la figura 23 se muestran los niveles de T3 y T4 en cerebro de ratas de las mismas camadas que las utilizadas en este estudio. Se puede ver el grado de hipotiroidismo que tenían las ratas LP cuando fueron sacrificadas, y aunque ésto no nos asegura que las ratas fueran hipotiroideas en el momento de la inyección, los datos hormonales de otras camadas de ratas LP obtenidos en este trabajo y a partir de experimentos realizados tanto en edad fetal (figura 7), como en edad neonatal (figuras 8 y 9), nos acercan a los niveles hormonales que podrían tener las ratas LI y LP durante su desarrollo fetal y neonatal que fueron utilizadas para este experimento concreto.

En la figura 24 se muestra el tanto por ciento de neuronas radiactivamente marcadas en cada una de las capas de la corteza en función del número de neuronas totales. Podemos observar que cuando la inyección se realizó en E-16 (tabla 3) en las ratas LI el mayor porcentaje de neuronas marcadas es encontrado en la capa V (20.3 %) y sobre todo VI (34.76 %); en ratas LP el mayor porcentaje es encontrado en capa V (20.1 %). Las diferencias fueron estadísticamente significativas en la capa VI (test de Student,  $P<0.001$ ) y sorprendentemente en la capa II/III ( $P<0.01$ ) que mostró un incremento en el tanto por ciento de neuronas marcadas en ratas LP con respecto a C. Aunque el máximo porcentaje de neuronas marcadas en ratas LI lo encontremos en capa VI (34.76 %) y en ratas LP en la capa V (20.1 %), no podemos asegurar que esta diferente distribución sea debida a un efecto de la carencia de hormona tiroidea, ya que las ratas hembras se mantuvieron 12 h con los machos y por tanto puede haber pequeñas diferencias en horas en la estimación del día E-0. Lo que sí se puede observar claramente es que el tanto por ciento de neuronas marcadas en ratas LP es menor que en ratas LI cuando la inyección se realiza en E-16. Esta observación es apoyada por los resultados obtenidos inyectando a las ratas en E-17 (tabla 4); en las ratas LI encontramos el mayor porcentaje de neuronas marcadas en las capas IV (24 %) y V (25.5 %), y en las ratas LP también en las mismas capas, capa IV (13.2 %) y V (9.19 %), aunque en menor proporción. En animales LI vemos que el máximo porcentaje de neuronas marcadas está más distribuido en las capas IV y V que en los animales LP cuyo máximo se encuentra en la capa IV. Esto como hemos dicho anteriormente puede ser debido al diseño experimental, pero el mayor porcentaje de neuronas marcadas en las ratas LI con respecto a ratas LP cuando se inyecta en E-17 sí parece ser un efecto producido por el déficit de HT. En las capas II/III hay un 11.07 % de neuronas marcadas en ratas LI frente a 4.73 % en ratas LP ( $P<0.05$ ). En la capa IV encontramos un 24 % en ratas LI frente a un 13.26 % en ratas LP ( $P<0.05$ ). En la capa V hay un 25.5 % de neuronas marcadas en ratas LI y un 9.19 % en ratas LP ( $P<0.001$ ). Finalmente en la capa VI tenemos un 15.6% de neuronas marcadas en ratas LI frente al 5% de LP ( $P<0.05$ ).

**Tabla 3:** valores medios ( $\pm$  EEM) del número de neuronas marcadas con timidina tritiada, número de neuronas totales y tanto por ciento de neuronas marcadas contenidas en una sonda de prueba situada en el área visual de la corteza cerebral (como se describe en material y métodos) en cortes de 7  $\mu$ m de espesor en ratas LI y LP de 22 días de edad postnatal y cuyas madres recibieron una inyección de timidina tritiada en el día 16 de gestación.

TIMIDINA TRITIADA ( INYECCION EN E-16 )						
		CAPAS CORTICALES AREA VISUAL				
		I	II/III	IV	V	VI
LI	neuronas marcadas	0	$2 \pm 0.59$	$8.3 \pm 1.46$	$13.3 \pm 2.27$	$31.3 \pm 2.83$
	neuronas totales	$25.4 \pm 3.27$	$118.6 \pm 3.57$	$60.7 \pm 3.69$	$65.5 \pm 2.97$	$90.9 \pm 3.62$
	% neuronas marcadas	0	$1.63 \pm 0.49$	$14.68 \pm 2.66$	$20.315 \pm 3.35$	$34.76 \pm 3.41$
LP	neuronas marcadas	$0.5 \pm 0.22$	$6.8 \pm 1.20$	$9.4 \pm 0.76$	$13.1 \pm 1.42$	$10.6 \pm 1.95$
	neuronas totales	$17.8 \pm 1.82$	$115.3 \pm 5.21$	$62.1 \pm 3.56$	$65.4 \pm 8.87$	$91.6 \pm 3.26$
	% neuronas marcadas	$2.98 \pm 1.24$	$6.35 \pm 1.51$ $P < 0.01$	$15.55 \pm 1.43$	$20.10 \pm 2.15$	$12.12 \pm 2.53$ $P < 0.001$

*Se indican las diferencias estadísticamente significativas en el tanto por ciento de neuronas marcadas entre ratas LI y ratas LP, test de t.*

**Tabla 4:** valores medios ( $\pm$  EEM) del número de neuronas marcadas con timidina tritiada, número de neuronas totales y tanto por ciento de neuronas marcadas contenidas en una sonda de prueba situada en el área visual de la corteza cerebral (como se describe en material y métodos) en cortes de 7  $\mu$ m de espesor en ratas LI y LP de 22 días de edad postnatal y cuyas madres recibieron una inyección de timidina tritiada en el día 17 de gestación.

TIMIDINA TRITIADA ( INYECCION EN E-17 )						
		CAPAS CORTICALES AREA VISUAL				
		I	II/III	IV	V	VI
LI	neuronas marcadas	0.2 $\pm$ 0.13	12.8 $\pm$ 2.57	15.1 $\pm$ 2.62	14.3 $\pm$ 2.12	14 $\pm$ 3.2
	neuronas totales	22.2 $\pm$ 1.8	115.6 $\pm$ 4.49	62.5 $\pm$ 2.41	59.8 $\pm$ 2.30	90.3 $\pm$ 3.36
	% neuronas marcadas	1.11 $\pm$ 0.77	11.07 $\pm$ 2.14	24.03 $\pm$ 3.73	25.53 $\pm$ 3.14	15.61 $\pm$ 3.70
LP	neuronas marcadas	0.6 $\pm$ 0.40	5.8 $\pm$ 1.30	8.9 $\pm$ 1.52	6.2 $\pm$ 0.94	4.9 $\pm$ 0.98
	neuronas totales	24.8 $\pm$ 1.82	122 $\pm$ 2.68	68.3 $\pm$ 2.40	69.7 $\pm$ 3.0	100.4 $\pm$ 3.49
	% neuronas marcadas	3.352 $\pm$ 2.62	4.73 $\pm$ 1.06 P < 0.05	13.26 $\pm$ 2.29 P < 0.05	9.19 $\pm$ 1.47 P < 0.001	5.08 $\pm$ 1.08 P < 0.05

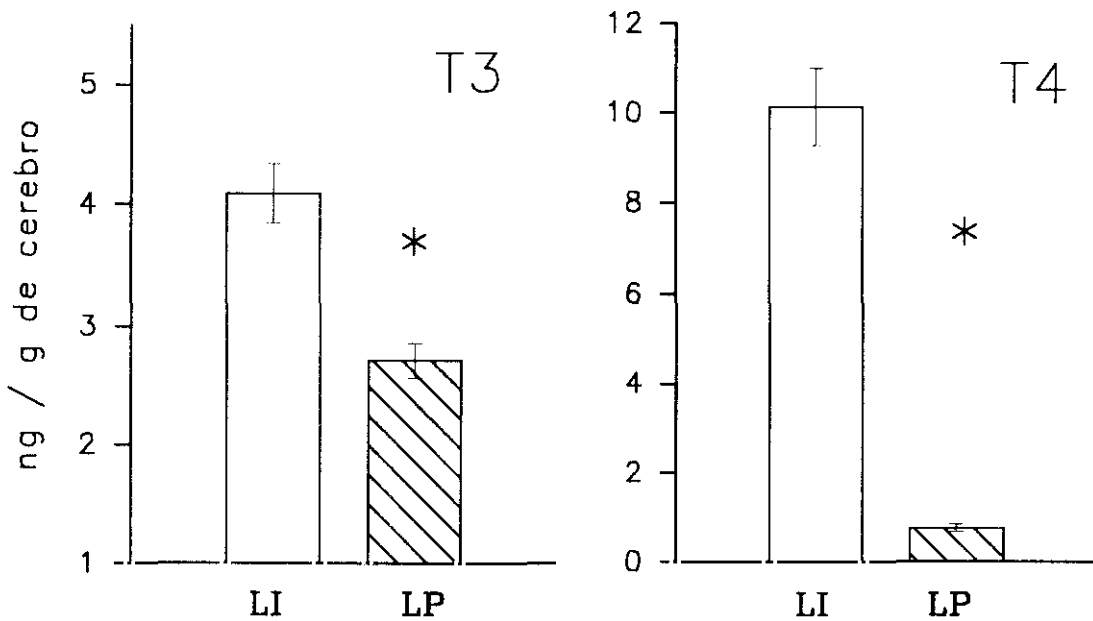
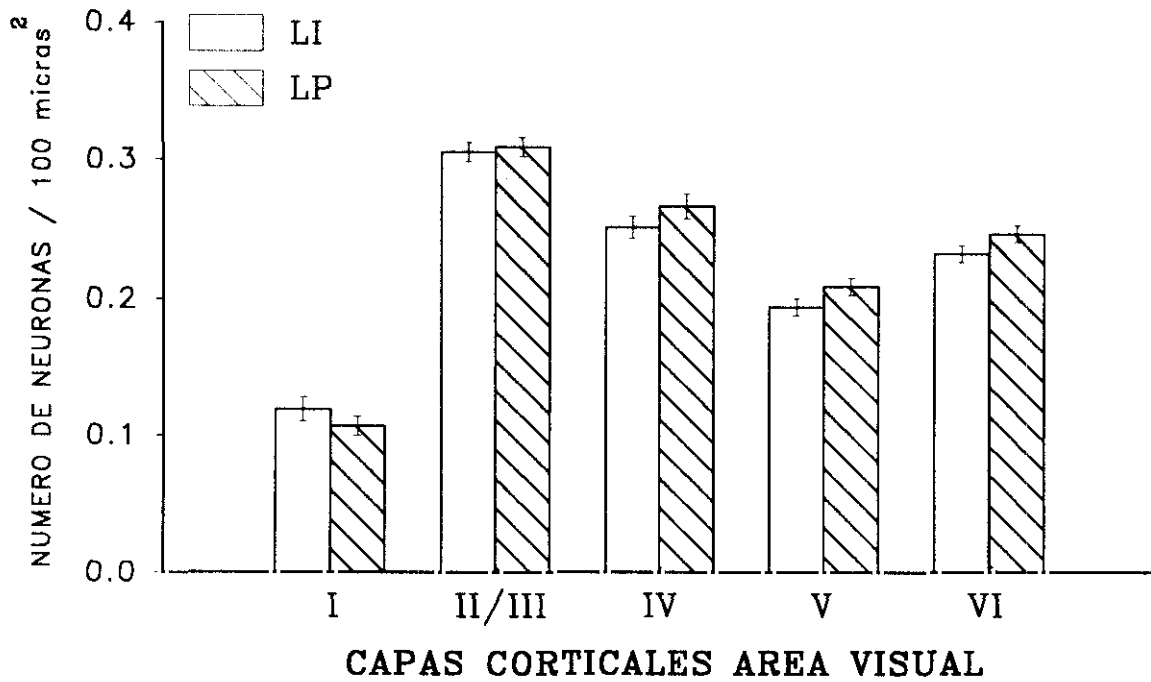
*Se indican las diferencias estadísticamente significativas en el tanto por ciento de neuronas marcadas entre ratas LI y ratas LP, test de t.*

**Tabla 5:** valores medios ( $\pm$  EEM) del número de neuronas /  $100 \mu\text{m}^2$  en las distintas capas corticales del área visual de la corteza cerebral, teñidas por el método de Nissl, en cortes de  $7 \mu\text{m}$  de espesor en ratas LI y LP de 22 días de edad postnatal.

NUMERO DE NEURONAS / $100 \mu\text{m}^2$					
	CAPAS CORTICALES AREA VISUAL				
	I	II/III	IV	V	VI
LI	$0.119 \pm 0.009$	$0.305 \pm 0.007$	$0.251 \pm 0.008$	$0.194 \pm 0.006$	$0.232 \pm 0.006$
LP	$0.107 \pm 0.007$	$0.309 \pm 0.007$	$0.266 \pm 0.009$	$0.209 \pm 0.006$	$0.246 \pm 0.006$

*No hubo diferencia estadísticamente significativa en ninguna de de las capas corticales estudiadas, test de t.*

# NISSL POSTNATAL 22 DIAS

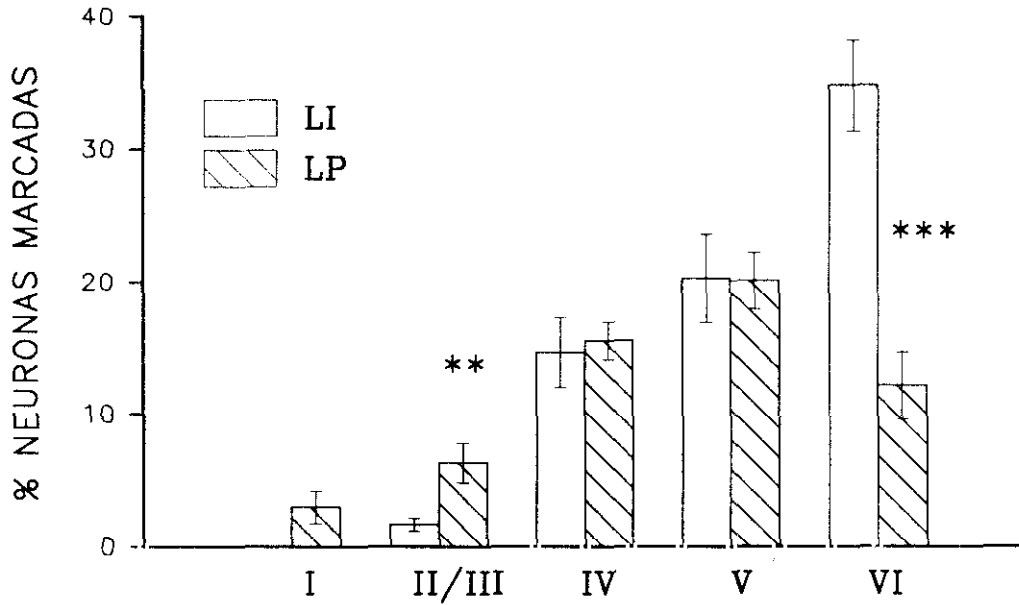


**Fig. 23.** En la figura superior se muestra el valor medio ( $\pm$  EEM) del número de neuronas / 100  $\mu\text{m}^2$  en las distintas capas corticales de ratas LI y LP de 22 días de edad postnatal. En la figura inferior tenemos la concentración de T3 y T4 en cerebro de ratas LI y LP de 22 días pertenecientes a las mismas camadas que las anteriores.

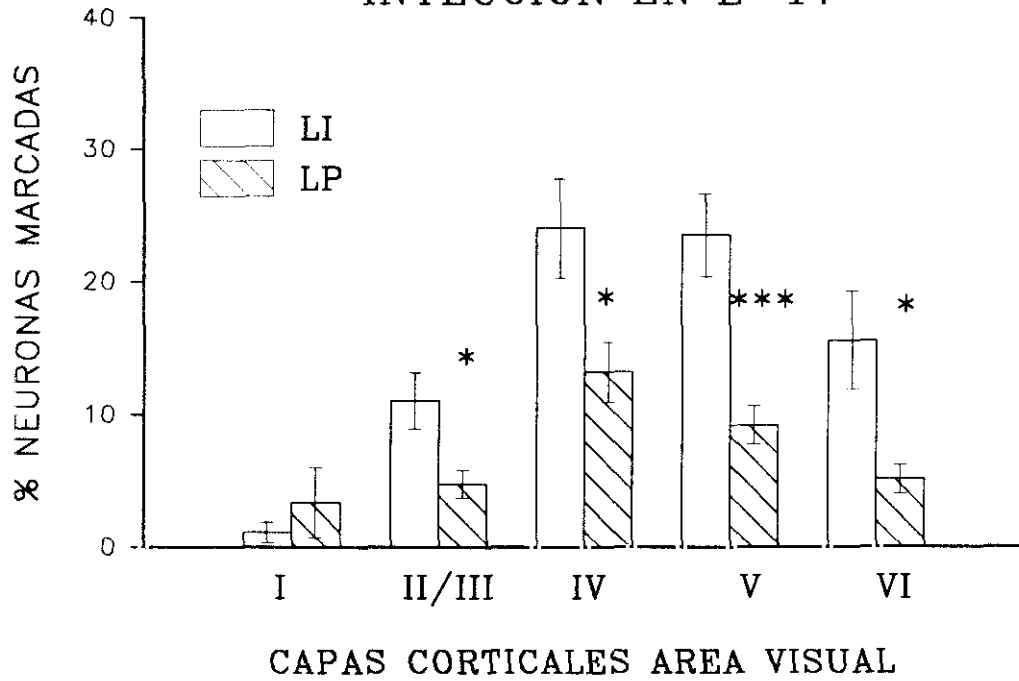
\* Diferencia estadísticamente significativa entre ratas LI y LP. Test de Q,  $P < 0.05$ .



# TIMIDINA TRITIADA INYECCION EN E-16



## INYECCION EN E-17



**Fig. 24.** Valor medio ( $\pm$  EEM) del porcentaje de neuronas marcadas con timidina tritiada en las diferentes capas de la corteza cerebral de ratas LI y LP de 22 días de edad postnatal y cuyas madres recibieron una inyección de timidina tritiada los días 16 (gráfica superior) y 17 (gráfica inferior) de gestación.

\*, \*\*, \*\*\* Diferencias estadísticamente significativas entre ratas LI y LP. Test de t,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  y  $P < 0.001$ , respectivamente.

#### **4.6. Densidad superficial de procesos MBP marcados en el estriado de ratas controles (C, LI) e hipotiroideas (LP, MMI).**

##### **4.6.1. Densidad superficial de procesos mielinizados en estriado total.**

El estudio de la mielinización en estriado durante el periodo postnatal se comenzó en P-5. Aunque hay estudios que indican que en el cerebro de roedores se puede localizar ya el RNAm del gen de la MBP desde P-4 (Barbaresse y col., 1978), nosotros no detectamos aún la proteína en P-5 (resultados no mostrados) en ninguna de las condiciones estudiadas. De acuerdo con otros autores los cuales indican que en estudios inmunocitoquímicos *in vivo*, la MBP no se detecta en los somas de oligodendrocitos (Reynolds y Wilkin, 1988), nosotros tampoco conseguimos identificar somas celulares mediante marcaje con anticuerpos contra la MBP. Obtuvimos según se observa en figuras 25, 26, 27 y 28 un marcaje de axones principalmente en cuerpo calloso y en la cápsula interna los cuales en P-10 (figura 25) ya habían comenzado a mielinizar, aumentando la intensidad del marcaje en P-15 (figura 26) y P-20 (figura 27), y a partir de aquí y según los datos cuantitativos obtenidos, la densidad superficial disminuye ligeramente en concordancia con los autores que observan un descenso en la acumulación del RNAm de la MBP en el final de la tercera semana postnatal (Barbaresse y col., 1978; Farsseti y col., 1991), aunque como se puede observar en P-32 el marcaje continua siendo muy intenso (figura 28).

La cuantificación de los datos en estriado total (tabla 6, figuras 29, 30 y 31) muestran que las ratas MMI tienen menor densidad superficial de MBP durante la segunda y tercera semana postnatal (test de Q;  $P < 0.001$  en P-10,  $P < 0.001$  en P-15 y  $P < 0.01$  en P-20) que las ratas C. Las ratas LP también presentan una densidad superficial de MBP menor que las C pero sólo en P-10 ( $P < 0.01$ ) y en P-15 ( $P < 0.05$ ) y no tan drástica como la presentada por las ratas MMI. Esto indica que el tratamiento con MMI ha causado una mayor disminución en la expresión de MBP que la producida por las DPY.

Teniendo en cuenta los niveles de HT que encontramos en el cerebro en las tres primeras semanas postnatales (figuras 8 y 9), podemos observar como en las ratas MMI sólo en P-20 se igualan los niveles de T3 entre C y MMI, mientras que las ratas LP tienen la T3 bastante elevada durante la primera semana postnatal; como veremos más adelante esto podría implicar el que la disminución en la expresión de MBP sea más acusada en ratas MMI que en ratas LP.



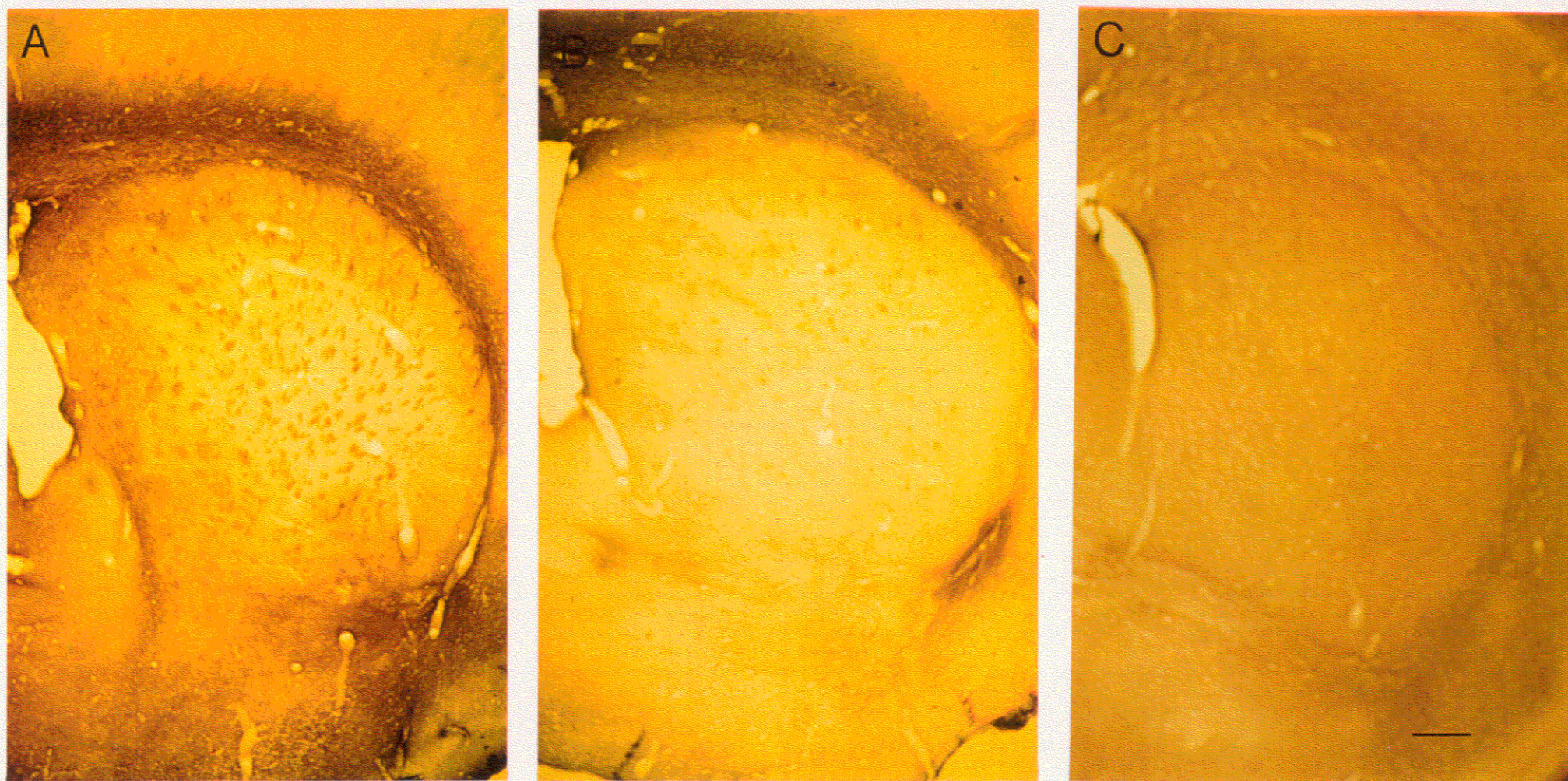
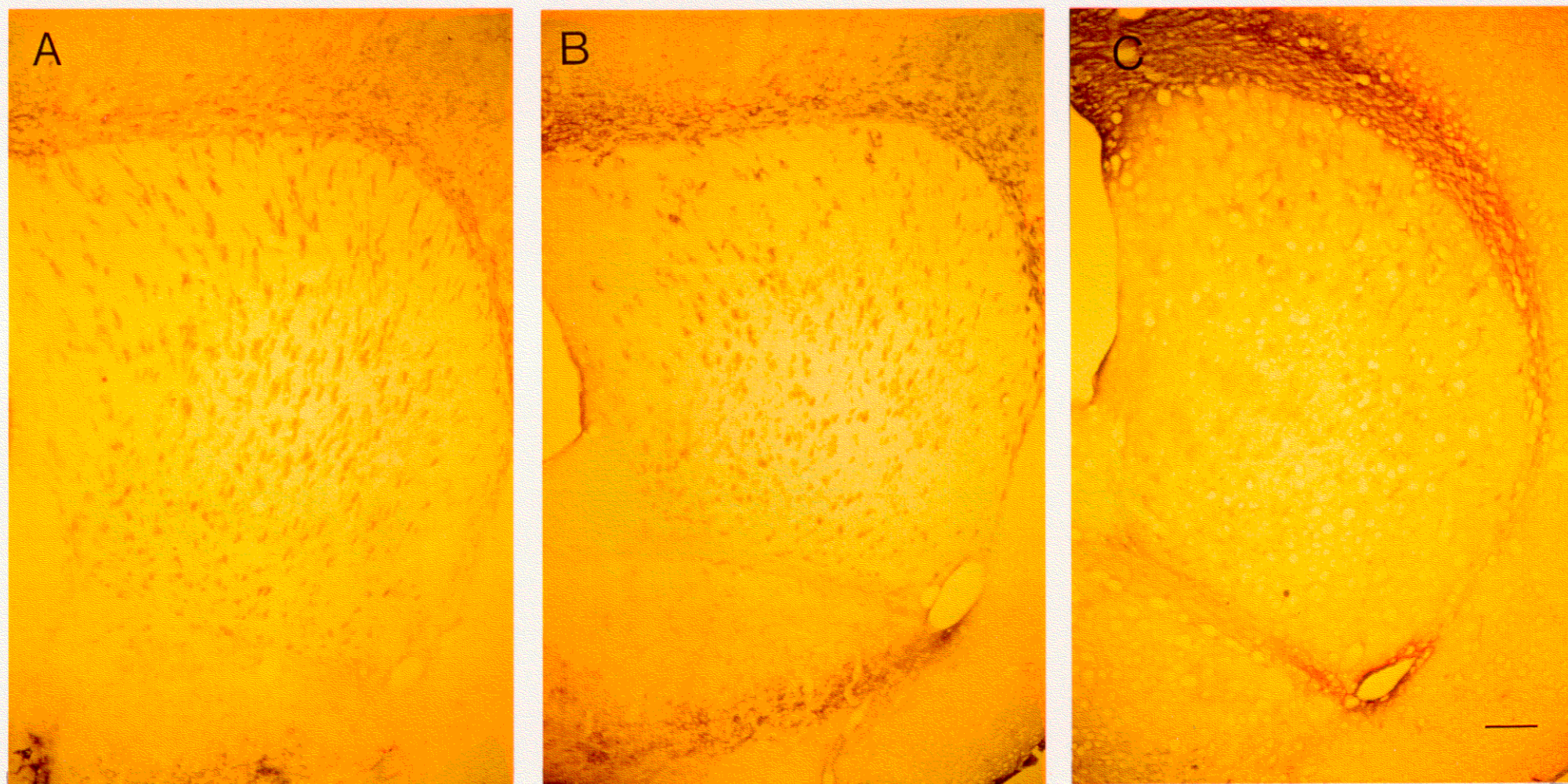


Fig. 25. Microfotografías de secciones de  $50\ \mu\text{m}$  de espesor del estriado de ratas P-10, en las que se muestran fibras mielinizadas que han sido marcadas con un anticuerpo contra la MBP. A, ratas controles; B, ratas mantenidas a dieta pobre en yodo con perclorato potásico; C, ratas tratadas con MMI en el agua de bebida. La barra horizontal indica  $300\ \mu\text{m}$  de longitud.





**Fig. 26.** Microfotografías de secciones de 50  $\mu\text{m}$  de espesor del estriado de ratas P-15, en las que se muestran fibras mielinizadas que han sido marcadas con un anticuerpo contra la MBP. A, ratas controles; B, ratas mantenidas a dieta pobre en yodo con perclorato potásico; C, ratas tratadas con MMI en el agua de bebida. La barra horizontal indica 300  $\mu\text{m}$  de longitud.



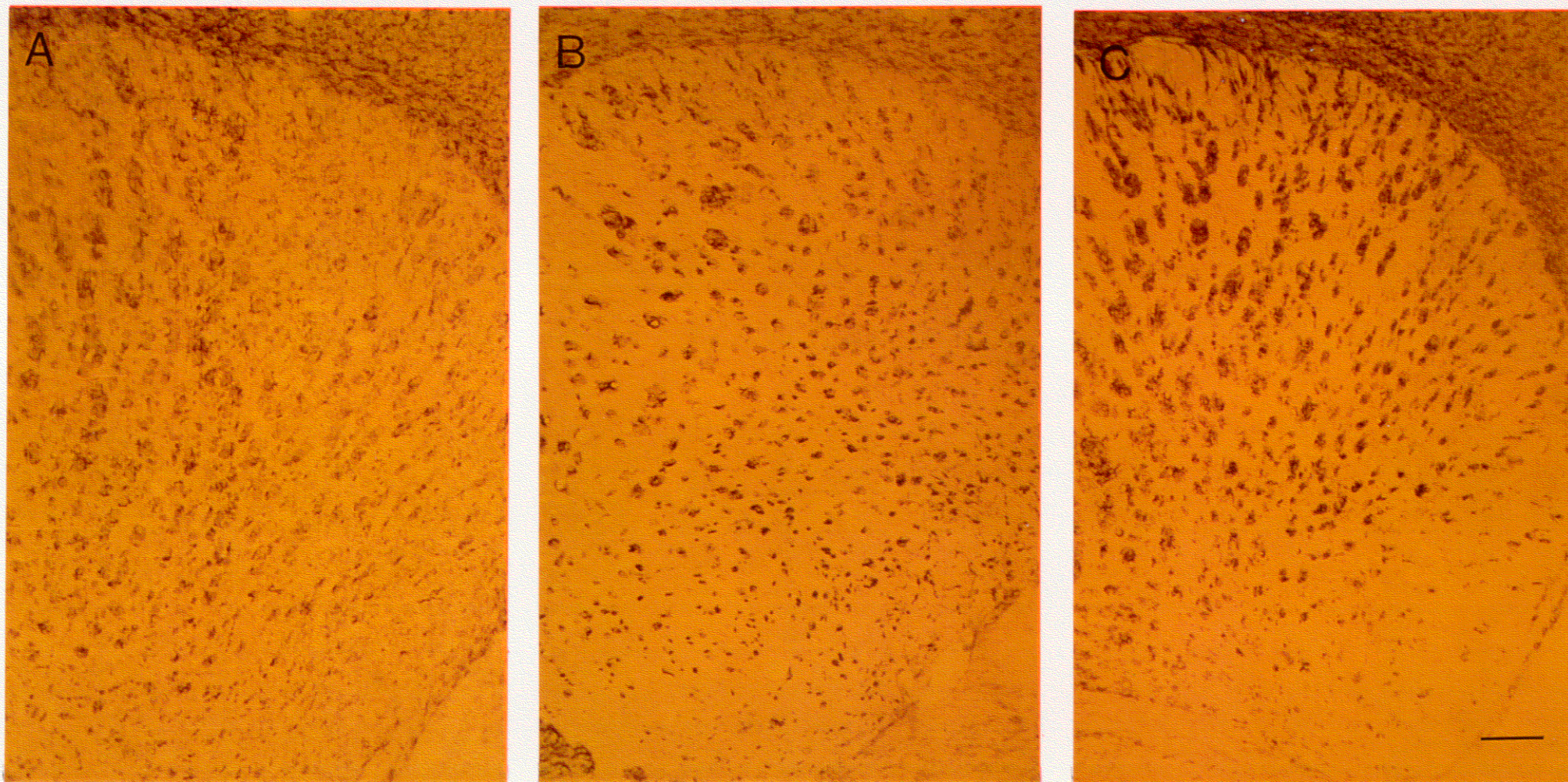


Fig. 27. Microfotografías de secciones de  $50\text{ }\mu\text{m}$  de espesor del estriado de ratas P-20, en las que se muestran fibras mielinizadas que han sido marcadas con un anticuerpo contra la MBP. A, ratas controles; B, ratas mantenidas a dieta pobre en yodo con perclorato potásico; C, ratas tratadas con MMI en el agua de bebida. La barra horizontal indica  $300\text{ }\mu\text{m}$  de longitud.



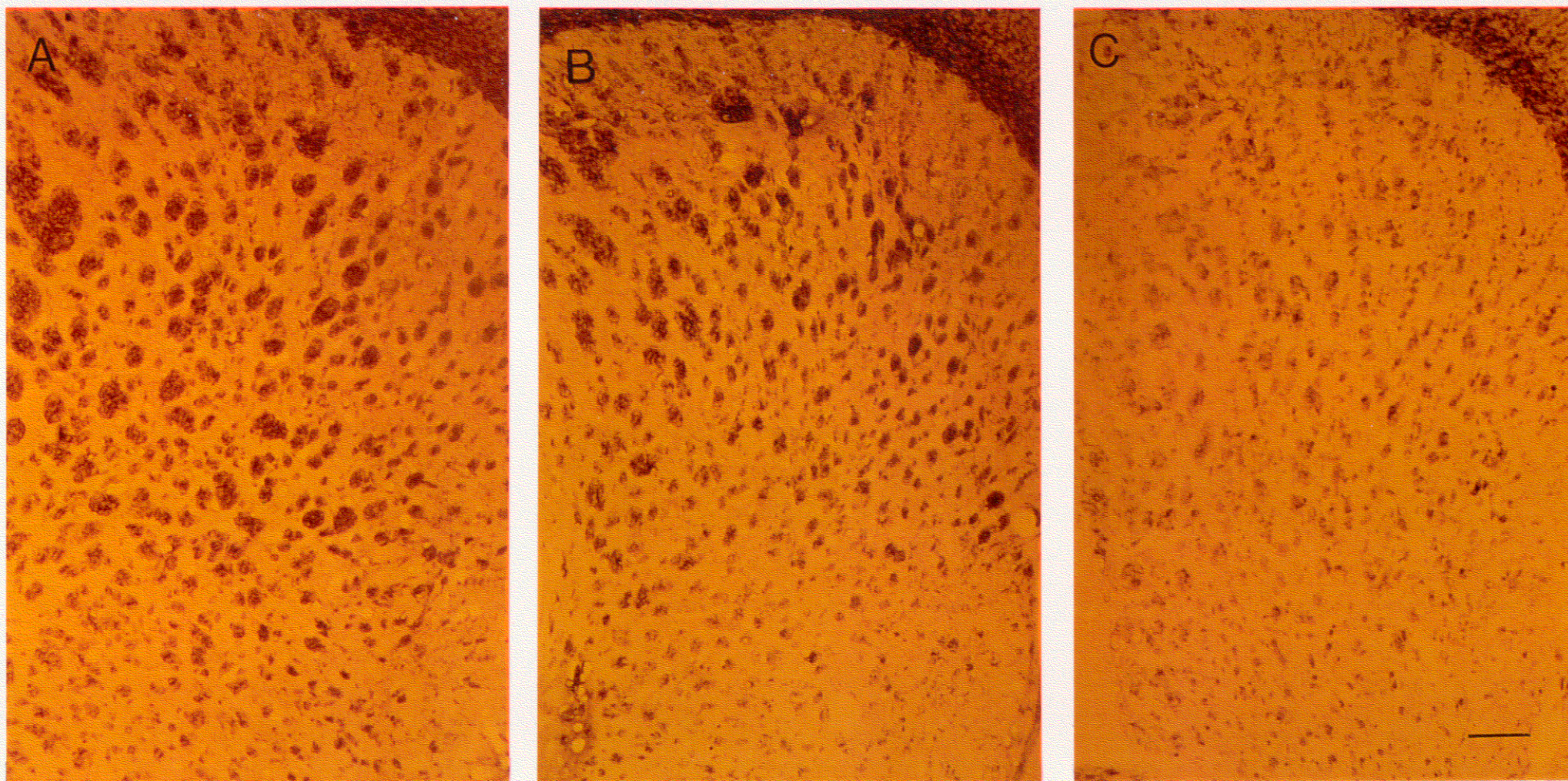


Fig. 28. Microfotografías de secciones de  $50\ \mu\text{m}$  de espesor del estriado de ratas P-32, en las que se muestran fibras mielinizadas que han sido marcadas con un anticuerpo contra la MBP. A, ratas controles; B, ratas mantenidas a dieta pobre en yodo con perclorato potásico; C, ratas tratadas con MMI en el agua de bebida. La barra horizontal indica  $300\ \mu\text{m}$  de longitud.

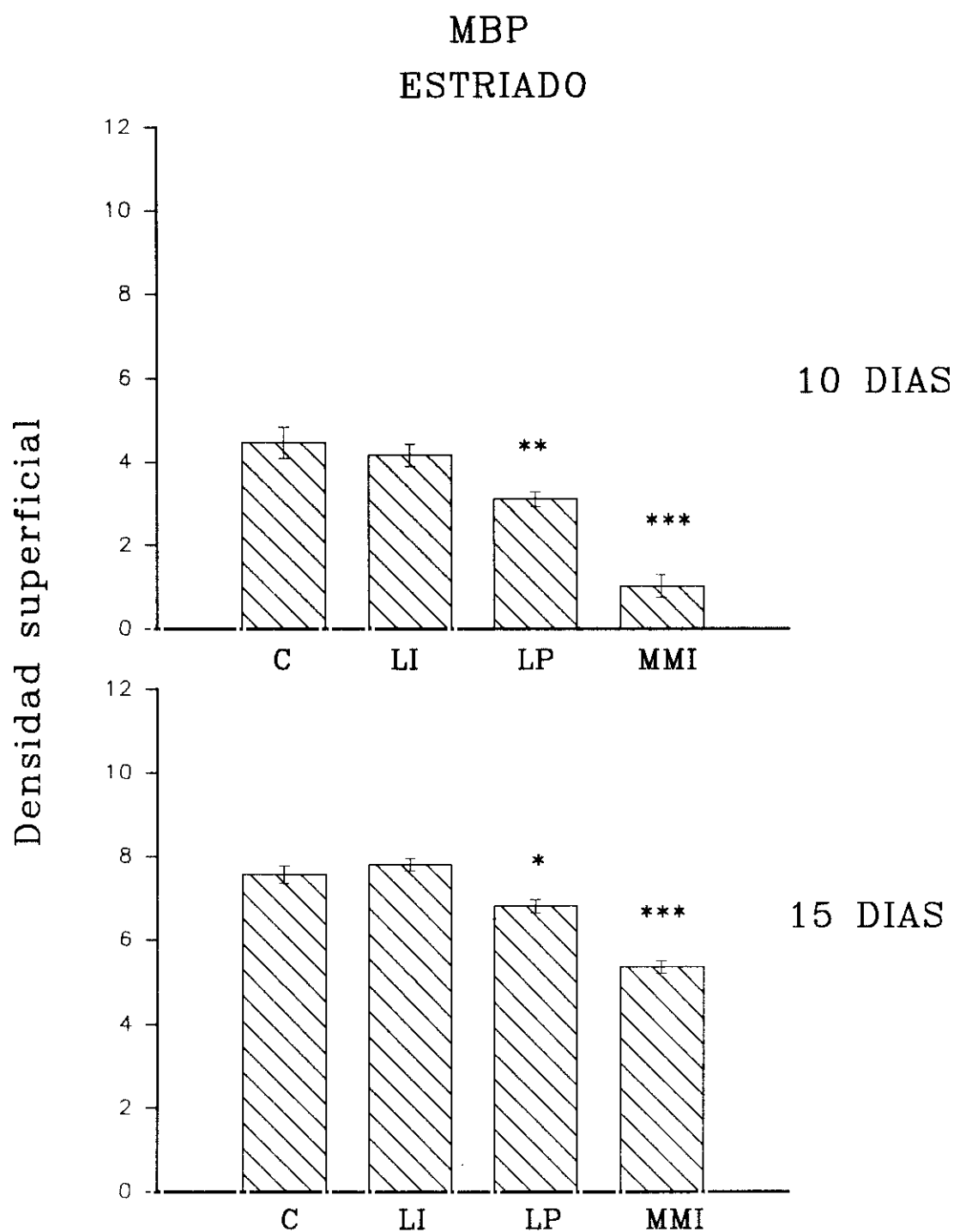


**Tabla 6:** valores medios ( $\pm$  EEM) de la densidad superficial de procesos marcados con un anticuerpo contra la MBP medidos en cortes de 50  $\mu$ m de espesor en el estriado de ratas C, LI, LP y MMI de 10, 15, 20 y 32 días de edad postnatal.

MBP				
ESTRIADO				
	C	LI	LP	MMI
P-10	4.47 $\pm$ 0.38	4.165 $\pm$ 0.272	3.105 $\pm$ 0.179 P < 0.01	1.02 $\pm$ 0.27 P < 0.001
P-15	7.564 $\pm$ 0.207	7.804 $\pm$ 0.155	6.806 $\pm$ 0.158 P < 0.05	5.360 $\pm$ 0.147 P < 0.001
P-20	9.710 $\pm$ 0.189	9.284 $\pm$ 0.221	9.311 $\pm$ 0.264	8.573 $\pm$ 0.159 P < 0.01
P-32	8.351 $\pm$ 0.201	8.015 $\pm$ 0.207	8.084 $\pm$ 0.168	8.227 $\pm$ 0.161

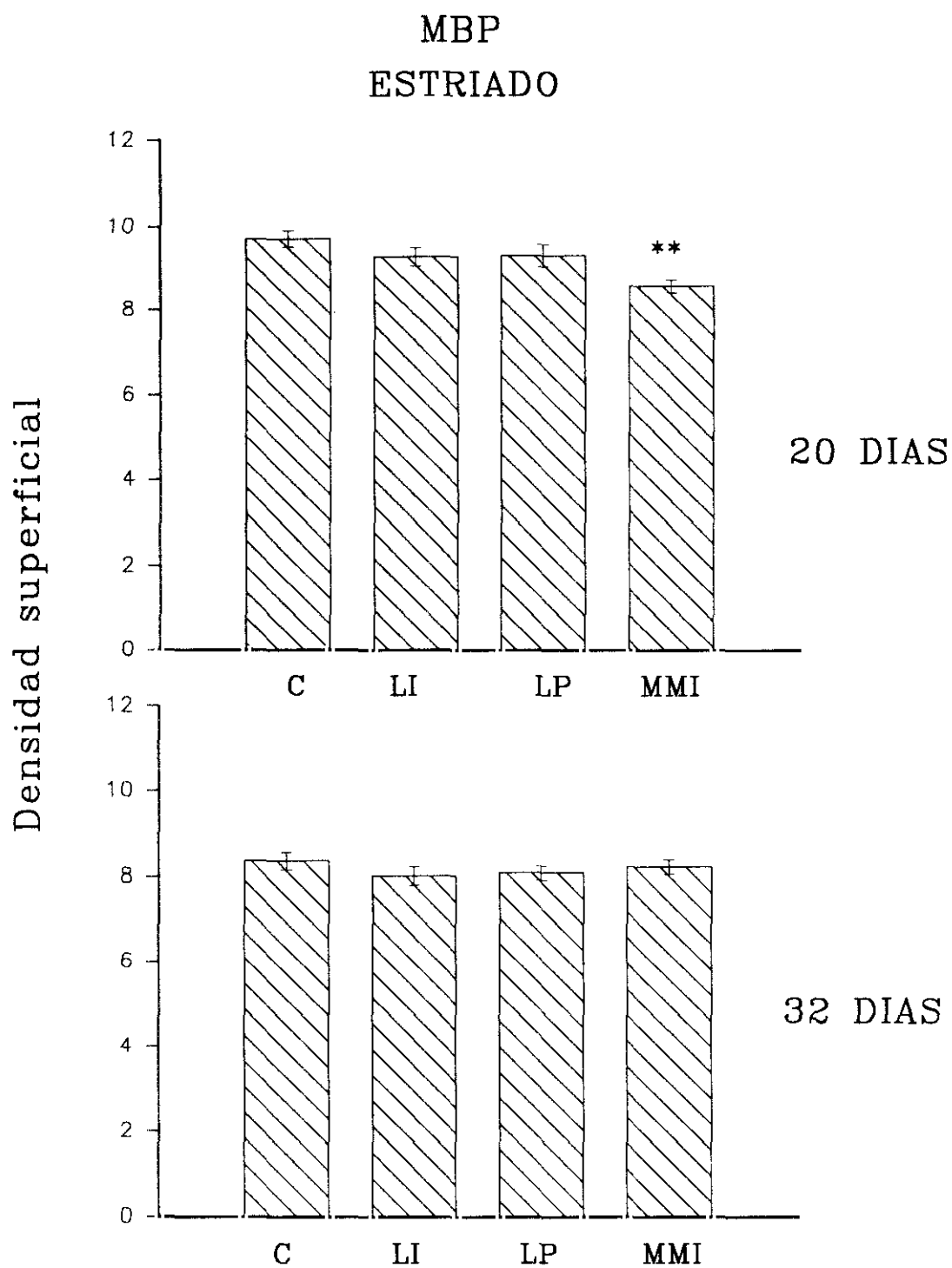
*Se indican las diferencias estadísticamente significativas respecto a ratas C, test de Q.*





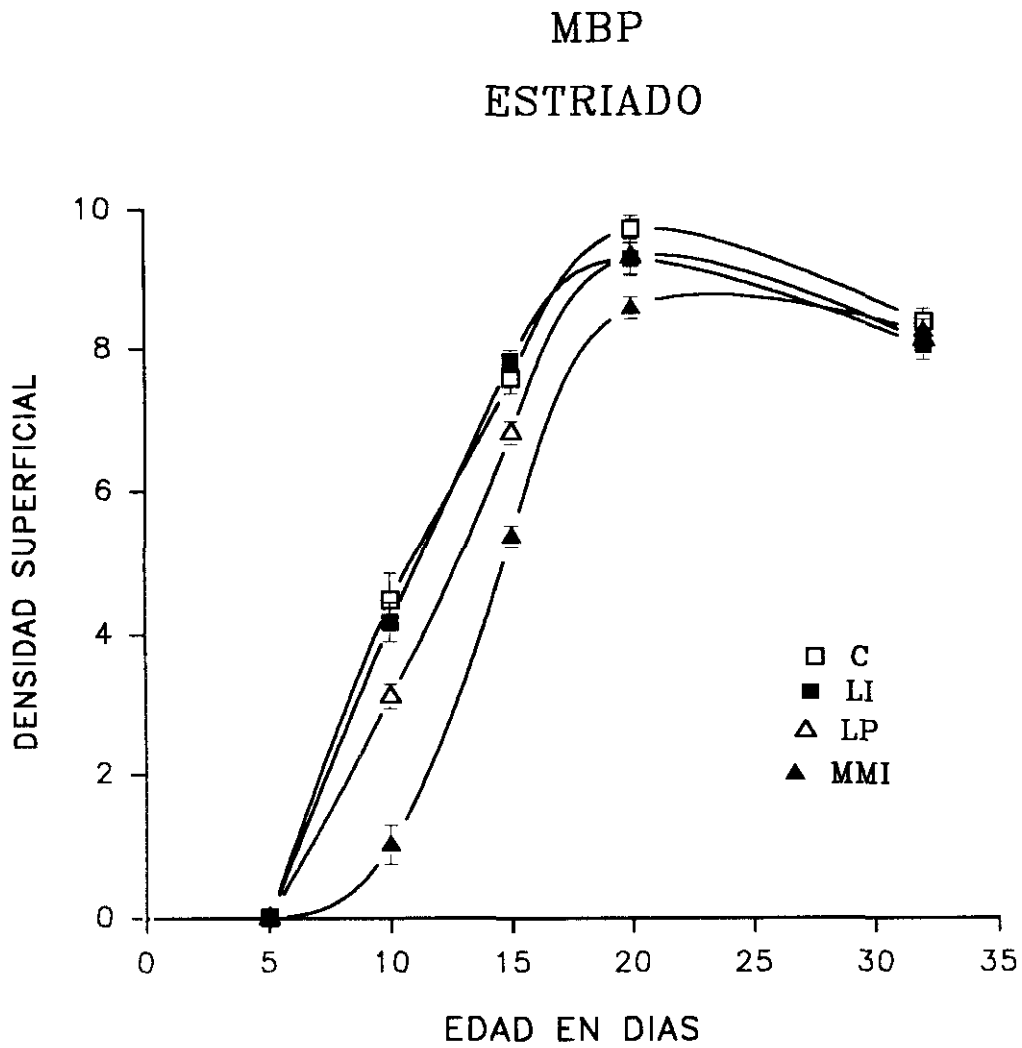
**Fig. 29.** Valores medios ( $\pm$  EEM) de la densidad superficial de procesos marcados con un anticuerpo contra la MBP medidos en el estriado de ratas C, LI, LP y MMI de 10 y 15 días de edad postnatal (gráfica superior e inferior, respectivamente)

\*, \*\*, \*\*\* Diferencias estadísticamente significativas con respecto a C. Test de Q,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  y  $P < 0.001$ , respectivamente.



**Fig. 30.** Valores medios ( $\pm$  EEM) de la densidad superficial de procesos marcados con un anticuerpo contra la MBP medidos en el estriado de ratas C, LI, LP y MMI de 20 y 32 días de edad postnatal (gráfica superior e inferior, respectivamente)

**\*\*** Diferencia estadísticamente significativa con respecto a C. Test de Q,  $P < 0.01$ .



**Fig. 31.** Valores medios ( $\pm$  EEM) de la densidad superficial de procesos marcados con un anticuerpo contra la MBP medidos en el estriado de ratas C, LI, LP y MMI de 10, 15, 20 y 32 días de edad postnatal. Los datos son los mismos que los mostrados en las figuras 29 y 30 pero en este caso no se indican las diferencias estadísticamente significativas.

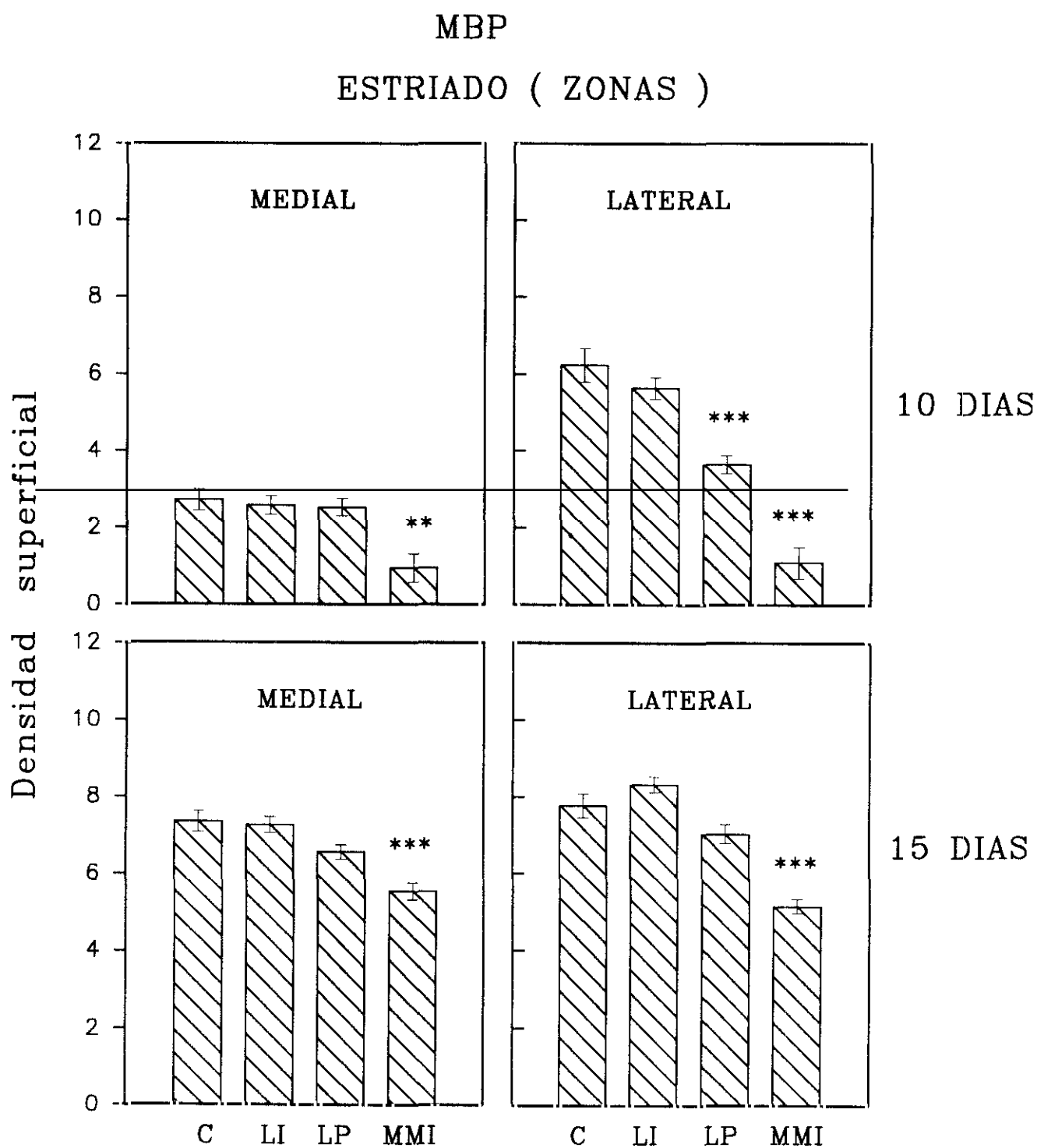
#### **4.6.2. Densidad superficial de procesos mielinizados en estriado lateral y medial.**

En el análisis de los datos estudiados según pertenezcan a la zona medial o a la zona lateral (tabla 7, figuras 32, 33 y 34) se observa que es la zona lateral del estriado la que está más afectada en las condiciones LP y MMI con respecto a C. En ratas MMI la densidad superficial de MBP con respecto a controles es menor, y esta diferencia es estadísticamente significativa en la zona lateral en la segunda y tercera semana postnatal (test de Q;  $P<0.001$  en P-10,  $P<0.001$  en P-15,  $P<0.01$  en P-20). En P-32 hay una recuperación de la expresión de MBP, similar a lo que acontecía en estriado total. La zona medial por el contrario sólo está afectada en P-10 ( $P<0.01$ ) y en P-15 ( $P<0.001$ ) y ya en P-20 se recupera la cantidad de MBP en estriado medial. La densidad superficial de MBP disminuye en P-10 en el área lateral ( $P<0.001$ ) de ratas LP ( $3.65\pm0.231$ ) con respecto a la densidad superficial de ratas C ( $6.23\pm0.43$ ). En el resto de las edades estudiadas (P-15, P-20 y P-32) no hay diferencia significativa de ratas LP con respecto a controles como se muestra en la tabla 7. La zona medial no se afecta en ratas LP en ninguna de las edades estudiadas. En el apartado anterior al considerar los datos de estriado total hemos visto que en las ratas MMI el daño causado por el tratamiento era mayor que en las ratas LP; al analizar los datos en estriado lateral y medial hemos comprobado que los daños en las fibras presumiblemente de la cápsula interna y que atraviesan en el estriado son más pronunciados en la zona lateral del estriado y siguen siendo mayores en ratas MMI (se afectan ambas zonas en P-10 y P-15). Además esta disminución en la expresión de MBP es más prolongada en el tiempo en las ratas MMI, en P-20 continua habiendo diferencias en ratas MMI respecto a C en la zona lateral ( $P<0.01$ ).

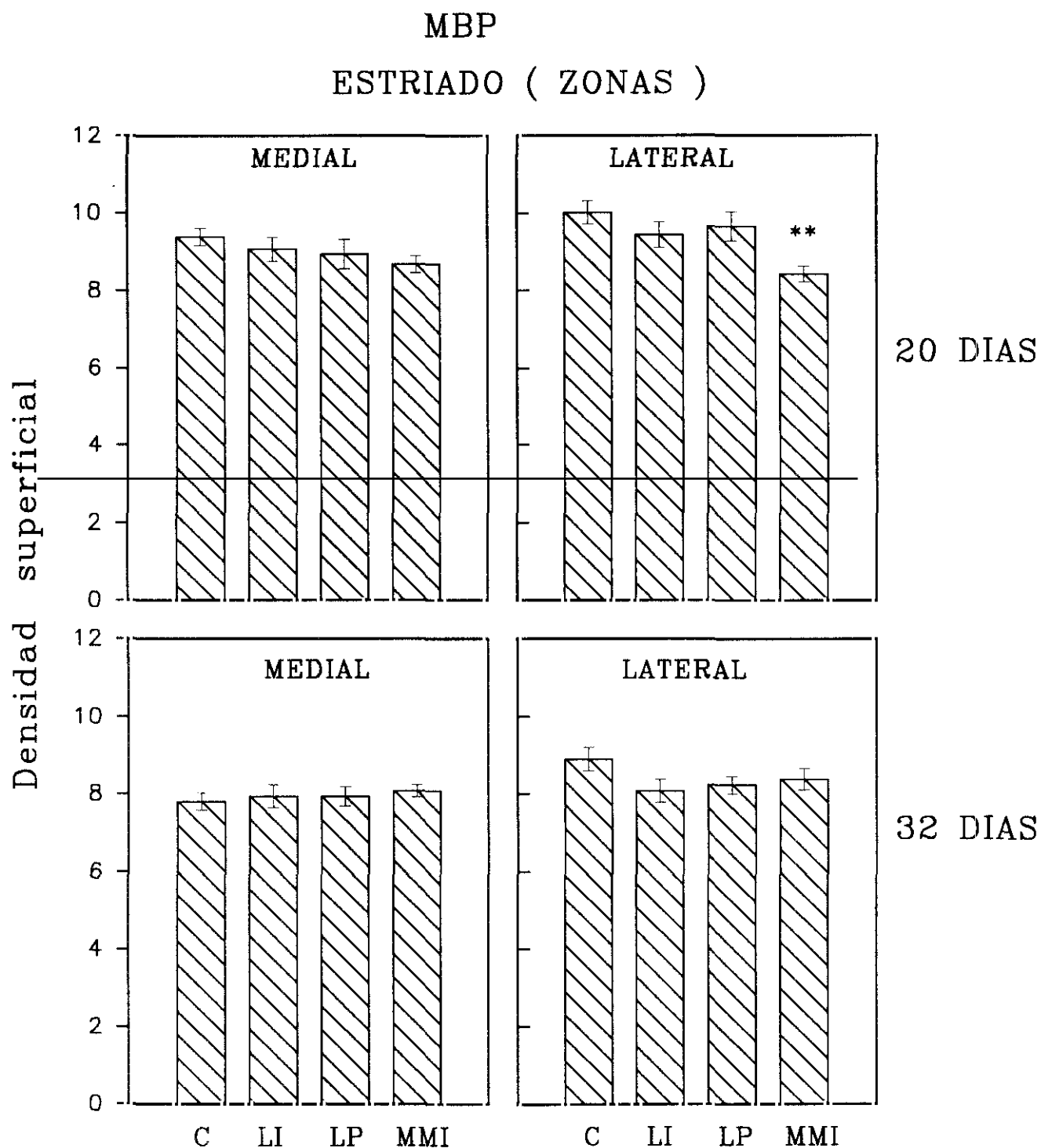
**Tabla 7:** valores medios ( $\pm$  EEM) de la densidad superficial de procesos marcados con un anticuerpo contra la MBP medidos en cortes de 50  $\mu$ m de espesor en las zonas lateral y medial del estriado en ratas C, LI, LP y MMI de 10, 15, 20 y 32 días de edad postnatal.

MBP					
ESTRIADO (ZONAS)					
		C	LI	LP	MMI
P-10	MEDIAL	$2.71 \pm 0.28$	$2.57 \pm 0.25$	$2.52 \pm 0.23$	$0.94 \pm 0.37$ $P < 0.01$
	LATERAL	$6.23 \pm 0.43$	$5.64 \pm 0.28$	$3.65 \pm 0.231$ $P < 0.001$	$1.09 \pm 0.41$ $P < 0.001$
P-15	MEDIAL	$7.35 \pm 0.27$	$7.26 \pm 0.21$	$6.56 \pm 0.19$	$5.55 \pm 0.22$ $P < 0.001$
	LATERAL	$7.78 \pm 0.31$	$8.33 \pm 0.19$	$7.04 \pm 0.25$	$5.16 \pm 0.19$ $P < 0.001$
P-20	MEDIAL	$9.39 \pm 0.22$	$9.08 \pm 0.30$	$8.95 \pm 0.37$	$8.69 \pm 0.22$
	LATERAL	$10.02 \pm 0.30$	$9.45 \pm 0.32$	$9.66 \pm 0.37$	$8.43 \pm 0.21$ $P < 0.01$
P-32	MEDIAL	$7.8 \pm 0.22$	$7.94 \pm 0.30$	$7.93 \pm 0.25$	$8.08 \pm 0.16$
	LATERAL	$8.90 \pm 0.30$	$8.08 \pm 0.29$	$8.23 \pm 0.23$	$8.38 \pm 0.27$

*Se indican las diferencias estadísticamente significativas respecto a ratas C, test de Q.*



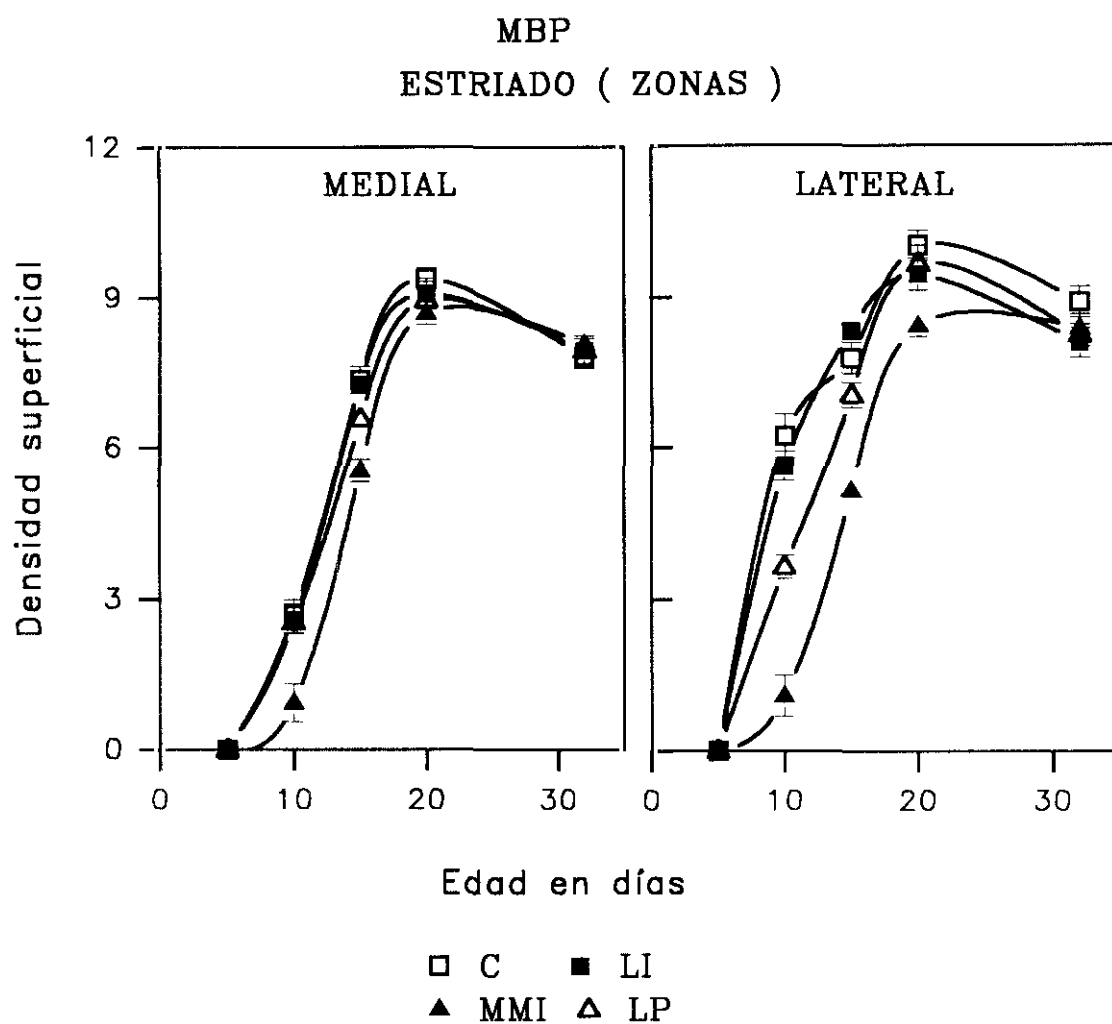
**Fig. 32.** Valores medios ( $\pm$  EEM) de la densidad superficial de procesos marcados con un anticuerpo contra la MBP medidos en las zonas lateral y medial del estriado de ratas C, LI, LP y MMI de 10 y 15 días de edad postnatal (gráficas superiores e inferiores, respectivamente) \*\* ,\*\*\* Diferencias estadísticamente significativas con respecto a C. Test de Q,  $P < 0.01$  y  $P < 0.001$ , respectivamente.



**Fig. 33.** Valores medios ( $\pm$  EEM) de la densidad superficial de procesos marcados con un anticuerpo contra la MBP medidos en las zonas lateral y medial del estriado de ratas C, LI, LP y MMI de 20 y 32 días de edad postnatal (gráficas superiores e inferiores, respectivamente)

**\*\*** Diferencia estadísticamente significativa con respecto a C. Test de Q,  $P < 0.01$ .





**Fig. 34.** Valores medios ( $\pm$  EEM) de la densidad superficial de procesos marcados con un anticuerpo contra la MBP medidos en las zonas lateral y medial del estriado de ratas C, LI, LP y MMI de 10, 15, 20 y 32 días de edad postnatal. Los datos son los mismos que los mostrados en las figuras 32 y 33 pero en este caso no se indican las diferencias estadísticamente significativas.

#### **4.6.3. Densidad superficial de procesos mielinizados en estriado DL, VL, VM y DM.**

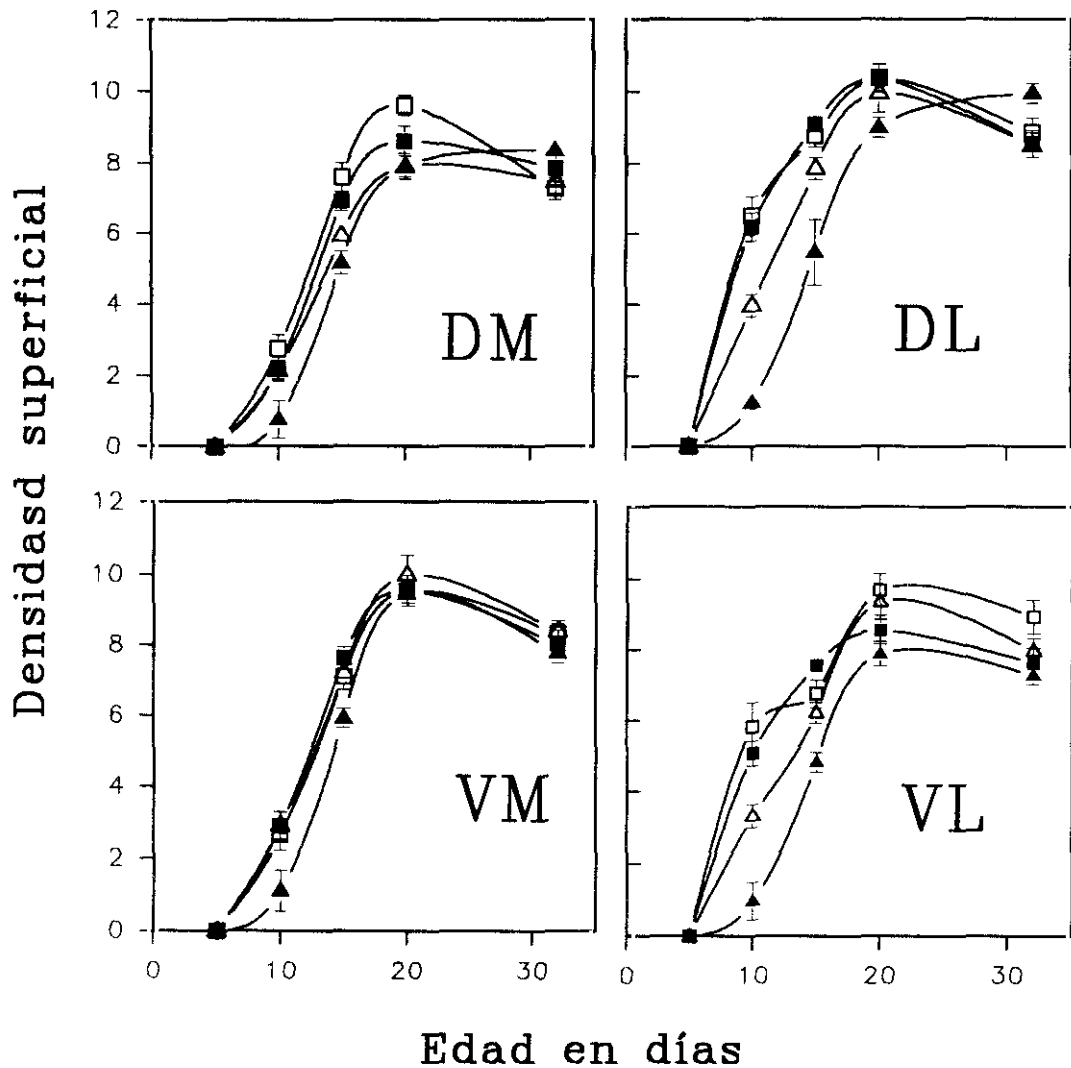
La densidad superficial de MBP procesando los datos en función de las cuatro zonas en las que hemos dividido el estriado (DL, VL, VM, DM) según se muestra en la tabla 8 y en la figura 35, parece confirmar todo lo expuesto en los dos apartados anteriores y además con este tipo de análisis podemos concluir qué parte de la zona lateral o medial se ve mas afectada según el tratamiento. Se observa que las zonas mas afectadas en ratas MMI son la VL y la DM. En el estriado lateral, la zona VL está afectada permanentemente, e incluso en P-32 no se ha producido una recuperación completa (test de Q,  $P < 0.05$ ) con respecto a ratas C. En el estriado medial, la zona DM es la única que está dañada e incluso permanece ligeramente afectada hasta P-20 donde la diferencia de densidad superficial es aún significativa con respecto a C ( $P < 0.05$ ). Por el contrario las ratas LP sólo presentan una diferencia importante con respecto a C en P-10 en las zonas DL ( $P < 0.001$ ) y VL ( $P < 0.01$ ). En P-15 las ratas LP tiene todavía menor densidad superficial de MBP, aunque analizado por zonas no es significativo. Estas diferencias en P-10 y P-15 no son tan acusadas como en ratas MMI, lo cual quiere decir que el tratamiento con DPY en la rata sólo origina una disminución en la expresión de MBP no tan severa y prolongada como en las ratas tratadas con MMI y que además coincide solamente con el periodo de inicio de la mielinización de las fibras de la cápsula interna, por lo que es posible que en la rata adulta estas diferencias que suceden durante el periodo postnatal entre ratas MMI y ratas LP sean capaces de influir de forma diferente en la futura estructura de los axones de la cápsula interna.

**Tabla 8:** valores medios ( $\pm$  EEM) de la densidad superficial de procesos marcados con un anticuerpo contra la MBP medidos en cortes de 50  $\mu$ m de espesor en las regiones dorsolateral (DL), ventrolateral (VL), ventromedial (VM) y dorsomedial (DM) del estriado en ratas C, LI, LP y MMI de 10, 15, 20 y 32 días de edad postnatal.

MBP					
ESTRIADO ( ZONAS )					
		C	LI	LP	MMI
P-10	DL	6.51 $\pm$ 0.56	6.19 $\pm$ 0.40	3.97 $\pm$ 0.314 P < 0.001	1.23 $\pm$ 0.19 P < 0.001
	VL	5.83 $\pm$ 0.68	5.08 $\pm$ 0.35	3.32 $\pm$ 0.33 P < 0.01	0.97 $\pm$ 0.51 P < 0.001
	VM	2.66 $\pm$ 0.44	2.89 $\pm$ 0.398	2.91 $\pm$ 0.37	1.11 $\pm$ 0.57
	DM	2.77 $\pm$ 0.38	2.212 $\pm$ 0.312	2.143 $\pm$ 0.287	0.77 $\pm$ 0.52 P < 0.05
P-15	DL	8.787 $\pm$ 0.31	9.103 $\pm$ 0.234	7.87 $\pm$ 0.309	5.474 $\pm$ 0.933 P < 0.001
	VL	6.767 $\pm$ 0.388	7.559 $\pm$ 0.204	6.215 $\pm$ 0.296	4.828 $\pm$ 0.280 P < 0.01
	VM	7.093 $\pm$ 0.374	7.628 $\pm$ 0.309	7.200 $\pm$ 0.242	5.931 $\pm$ 0.277
	DM	7.609 $\pm$ 0.415	6.926 $\pm$ 0.284	5.938 $\pm$ 0.224	5.171 $\pm$ 0.327 P < 0.01
P-20	DL	10.359 $\pm$ 0.372	10.356 $\pm$ 0.402	9.958 $\pm$ 0.550	9.009 $\pm$ 0.272
	VL	9.684 $\pm$ 0.479	8.561 $\pm$ 0.404	9.371 $\pm$ 0.504	7.889 $\pm$ 0.340 P < 0.05
	VM	9.532 $\pm$ 0.343	9.536 $\pm$ 0.436	9.981 $\pm$ 0.564	9.455 $\pm$ 0.227
	DM	9.264 $\pm$ 0.285	8.634 $\pm$ 0.414	7.933 $\pm$ 0.367	7.937 $\pm$ 0.290 P < 0.05
P-32	DL	8.872 $\pm$ 0.406	8.553 $\pm$ 0.381	8.511 $\pm$ 0.338	9.493 $\pm$ 0.275
	VL	8.929 $\pm$ 0.475	7.621 $\pm$ 0.420	7.966 $\pm$ 0.355	7.267 $\pm$ 0.265 P < 0.05
	VM	8.309 $\pm$ 0.284	8.013 $\pm$ 0.387	8.375 $\pm$ 0.307	7.767 $\pm$ 0.284
	DM	7.292 $\pm$ 0.307	7.872 $\pm$ 0.488	7.498 $\pm$ 0.345	8.379 $\pm$ 0.228

*Se indican las diferencias estadísticamente significativas respecto a ratas C, test de Q.*

MBP  
ESTRIADO ( ZONAS )



**Fig. 35.** Valores medios ( $\pm$  EEM) de la densidad superficial de procesos marcados con un anticuerpo contra la MBP medidos en las zonas dorsolateral (DL), dorsomedial (DM), ventrolateral (VL) y ventromedial (VM) del estriado de ratas C, LI, LP y MMI de 10, 15, 20 y 32 días de edad postnatal. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto a C se muestran en la tabla 8.

## 5. DISCUSION

### 5.1. Modelos experimentales de hipotiroidismo.

Se ha observado que las HT son necesarias para el feto antes de que comience la función tiroidea fetal (FTF), que en la rata tiene lugar aproximadamente entre E-17,5 y E-18. Weiss y Noback (1949) demostraron un retraso en la aparición de centros de osificación en E-16 en ratas cuyas madres fueron tratadas con el bociógeno tiouracilo. Posteriormente en otros estudios se volvió a cuestionar si el feto requería HT antes de la FTF porque se pensaba que la placenta era impermeable a HT (Hamburgh, 1969; Fisher y col., 1977). Finalmente se ha demostrado que las HT son capaces de cruzar la placenta, ya que se ha detectado la presencia de HT mucho antes de la FTF (Obregón y col., 1984; Morreale de Escobar y col., 1989), habiéndose detectado HT en el embrión trofoblasto a E-10 (Obregón y col., 1984). Asimismo se ha demostrado mediante hibridación *in situ* la presencia de receptores nucleares para HT ya en E-14 (Perez-Castillo y col., 1985). También se ha probado que existe transferencia de T3 y T4 marcadas desde la madre al feto en edades comprendidas desde E-9 a E-15 (Woods y col., 1984). Nosotros hemos utilizado dos modelos experimentales en los cuales provocamos hipotiroidismo durante toda la gestación y en los que se altera la normal transferencia de dichas hormonas al feto. Un modelo ha consistido, como hemos descrito detalladamente en el apartado 3.1, en la utilización de dietas con bajo contenido en yodo (con o sin perclorato potásico) en las ratas madres y posteriormente en los neonatos tras el destete, y en el otro modelo hemos añadido el bociógeno MMI en el agua de bebida a las ratas madres ya desde 10 días antes de ser cruzadas y también durante los periodos de gestación y lactancia, siguiendo el tratamiento con los neonatos después del destete. Los diferentes efectos de ambos modelos experimentales en el peso corporal, niveles cerebrales de HT y diversos sucesos que acontecen durante el desarrollo del SNC serán discutidos en este capítulo.

### **5.1.1. Pesos y niveles hormonales de ratas C y MMI.**

El MMI presenta ciertas ventajas sobre otro de los bociógenos clásicamente utilizado, entre ellas la de atravesar con mayor facilidad que el PTU la barrera placentaria (Formiguera y Casals, 1988). Si se emplea PTU como antitiroideo en humanos, los efectos duran menos y las dosis empleadas han de ser mucho mayores (Marchant y col., 1978), además en la rata el PTU se tiene que administrar por intubación gástrica; otro inconveniente es que produce también inhibición de la actividad desyodasa tipo I en hígado. Se ha utilizado habitualmente por otros autores el MMI para estudiar los efectos del hipotiroidismo en el cerebro, pero añadido en el agua de bebida como muy pronto a partir del noveno día de gestación y combinado con posterior tiroidectomía quirúrgica en P-5 (Muñoz y col., 1991). Nosotros, en cambio, hemos comenzado el tratamiento con MMI a las ratas madre desde 10 días antes de comenzar el periodo de gestación y, como se muestra en la figura 6, en el momento de ser cruzadas las madres, obteníamos ya unos niveles muy bajos de T3 y T4 en las madres.

Nuestros resultados indican que el MMI suministrado a las madres desde los 10 días antes de ser cruzadas produce una disminución significativa en el peso corporal de los fetos E-21 respecto a los C (figura 5a), aunque se ha demostrado que en los fetos E-21 procedentes de ratas madres tratadas con MMI desde el día 16 de gestación, existe un incremento del peso corporal (Morreale de Escobar y col., 1988) que podría ser debido a un aumento en la retención de agua que sucede en casos de hipotiroidismo (De Groot y col., 1984). La reducción que nosotros hemos observado en el peso corporal, se parece más al resultado que se obtiene en los fetos cuya madre ha sido sometido previamente a tiroidectomía quirúrgica, ya que este caso se observa una disminución del peso de los fetos (Morreale de Escobar y col., 1985). En madres tiroidectomizadas el déficit de HT sucede ya desde la fase inicial (anabólica) de la gestación, por lo cual se reduce el peso de los fetos (Bonet y Herrera, 1988). Nosotros también provocamos mediante nuestro tratamiento con MMI bajos niveles de HT durante toda la gestación. Este modelo experimental que hemos desarrollado en el presente

trabajo con MMI se asemeja a la situación de hipotiroideos congénitos procedentes de madres hipotiroideas. Con este modelo hemos producido un hipotiroidismo muy severo y ésto se refleja en el peso corporal en edad neonatal (figura 5c) que no logra recuperarse con respecto a las ratas C en ninguna de las edades.

El tratamiento con MMI ha producido una reducción significativa en la cantidad de T3 y T4 en ratas MMI en E-21 (figura 7), lo que está de acuerdo con trabajos previos en los cuales se obtuvo también reducción en la cantidad de HT en E-21, aunque el tratamiento con MMI comenzó en E-14 (Calvo y col., 1990) o en E-16 (Morreale de Escobar y col., 1988). Esta reducción en los niveles de HT en ratas MMI con respecto a C (figura 8) se ha mantenido durante el periodo postnatal estudiado (excepto en P-20 donde existe un aumento de T3 en ambas condiciones experimentales, C y MMI). Se puede observar también que a partir del nacimiento el tanto por ciento de T3 en cerebro de ratas MMI con respecto a C es mucho menor durante las dos primeras semanas de desarrollo neonatal que el tanto por ciento de T3 en ratas LP. Esto podría tener como consecuencia, que el efecto del hipotiroidismo inducido por el MMI debería ser más marcado que el producido en las ratas LP, sobre aquellos procesos cuyo inicio tiene comienzo en el SNC en estas dos primeras semanas de vida postnatal, como por ejemplo las últimas etapas de la migración neuronal en el caso de la corteza cerebral, la llegada de aferentes talámicas, el comienzo de la sinaptogénesis y el inicio de la diferenciación de los oligodendrocitos y de la mielinización.

#### **5.1.1. Pesos y niveles hormonales de ratas LI, L y LP.**

En E-21, no hemos encontrado diferencias entre los pesos de animales LI, L y LP (figura 5a). Previamente se había observado en la rata que en edad fetal los efectos de la deficiencia de yodo sobre el peso corporal (Escobar del Rey y col., 1986) son menos marcados que los encontrados en fetos procedentes de madres tiroidectomizadas (Morreale de Escobar y col., 1985). Durante el desarrollo neonatal hemos visto que no



existen diferencias entre el peso corporal de ratas LI y ratas LP (figura 5d). Cuando se utilizan DPY en la rata, encontramos que los niveles circulantes en sangre de T4 son muy bajos, los niveles de TSH son elevados, pero los niveles de T3 son normales (Santiesteban y col., 1982). Estas son las condiciones que se dan entre los habitantes de áreas deficientes de yodo y esta situación también se ha reproducido en modelos animales como por ejemplo en la oveja (Potter y col., 1982). Este nivel normal de T3 puede explicar el que los pesos de las ratas LP no se alteren, para ello es importante recordar la regulación positiva que tiene la T3 sobre la expresión de la GH en la adenohipófisis (Seo y col., 1979; Mirell y col., 1987)

De acuerdo con los resultados obtenidos por Obregón y col. (1991) en cerebros fetales de ratas mantenidas a DPY, hemos observado que existen diferencias en E-21 en los niveles de T3 y T4 en cerebro de ratas L y LP con respecto a ratas LI (figura 7). A partir del nacimiento, los experimentos se llevaron a cabo prescindiendo de la condición experimental L, ya que con la utilización de perclorato potásico en las dietas se pretendió evitar en la medida de lo posible, el moderado incremento en el aporte de yodo al neonato a través de la leche materna (Potter y col., 1959). Este pequeño incremento junto con el aumento de la desyodación de T4 en el cerebro hace que en las primeras etapas de desarrollo neonatal el aporte de T3 al cerebro pueda ser suficiente para evitar que se produzcan graves alteraciones en el cerebro (Escobar del Rey y col., 1987, Obregón y col., 1991). A pesar de intentar evitar lo máximo posible el aumento de la disponibilidad de yodo en el lactante con el ion perclorato, observamos que en los primeros días postnatales la T3 cerebral en ratas LP experimenta un aumento con respecto a ratas LI (figura 8 y 9), quizás porque la actividad desyodasa tipo II en cerebro había sido muy elevada. Posteriormente y a partir de P-10 los niveles de T3 y T4 en ratas LP vuelven a descender significativamente, excepto en P-30 donde es posible que haya ocurrido en estas ratas LP otro fuerte incremento de la actividad desyodasa tipo II.

## **5.2. Estudio de la glía radial en edad fetal en el hipocampo de ratas controles (C, LI) e hipotiroideas (L, LP y MMI).**

El primero de los objetivos planteados en el presente trabajo es averiguar como afectan las DPY (ratas L y LP) y el MMI a la formación de la glía radial y a la expresión de GFAP en edad fetal. Se ha hecho este estudio en hipocampo porque observamos que la glía radial apenas expresa GFAP en el periodo embrionario en la corteza cerebral y nuestra intención fue encontrar una estructura en la que hubiese expresión de GFAP pero sin entrar en los primeros estadios postnatales en los que encontraríamos posiblemente un aumento de la actividad desyodasa tipo II en las ratas tratadas con DPY (Obregón y col., 1991), como se muestra en las figuras 8 y 9. En ellas podemos observar un claro incremento en el contenido de T3 en cerebro de ratas LP en P-5. En el hipocampo existen además una serie de cambios morfológicos en ratas hipotiroideas e hipertiroideas (Rabie y col., 1979; para revisión ver Gould y col., 1991), lo que nos llevó a considerar dicha estructura para llevar a cabo nuestro trabajo. Centramos el estudio en E-21 porque en esta edad el déficit de la T3 cerebral en ratas que han sido mantenidas a DPY es el más acusado durante el periodo fetal. En E-21 además existen gran cantidad de fibras que podemos marcar con anti-GFAP y una distribución más o menos regular en el área CA1 en la que se pueden distinguir con claridad las fibras GFAP positivas que se encuentran entre los somas de las neuronas piramidales que no han sido teñidas. A esta edad parece haberse completado la migración en el estrato de células piramidales del área CA1; posteriormente este estrato empieza a curvarse lo que origina el inicio de la morfogénesis de CA3 (Altman y Bayer, 1990b). También hemos incluido en este estudio las ratas MMI con objeto de averiguar si este bociógeno tiene el mismo efecto en la maduración de la glía radial en el hipocampo que las DPY, ya que los niveles de HT son también muy bajos en edad fetal, tanto en el suero de las madres (figura 6) como en el cerebro de los fetos E-21 (figura 7).

Se ha observado que tanto en las ratas tratadas con DPY (con o sin perclorato), como en las ratas MMI, no se alteran significativamente el número total de procesos

gliales “inmaduros” marcados con el anticuerpo RAT-401 en el área CA1 de hipocampo (tabla 1), y que por el contrario sí disminuyen de forma significativa el número de fibras GFAP inmunoreactivas (tabla 2). Se ha demostrado mediante experimentos *in vivo* (Caviness y col., 1989; Stichel y col., 1991; para revisión ver Camerón y Rakic, 1991) e *in vitro* (Culican y col., 1990), que la transformación morfológica de la células de glía radial en astrocitos ocurre junto con una pérdida de inmunoreactividad para RC1, RC2, RAT-401 y vimentina (entre otros antígenos), y un aumento en la expresión de GFAP, por lo que probablemente estas fibras que nosotros hemos visto que están expresando GFAP también contienen nestina. Nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros autores también en hipocampo los cuales utilizan PTU como bociógeno (Ramie y Rabie, 1988). Aunque su estudio se centra más en la fimbria, giro dentado y área CA3, ellos no observan diferencias en los animales hipotiroides con respecto a los normales en la inmunoreactividad para vimentina en el hipocampo, pero si observan que existe una alteración en la maduración de estos procesos gliales que consiste en una expresión menor de GFAP y posteriormente en un número de astrocitos también menor en el hilus en P-35. En ratas hipertiroideas, las cuales fueron tratadas neonatalmente con HT, se observa un incremento significativo en la densidad de astrocitos GFAP inmunomarcados y una prematura desaparición de glía inmunoreactiva para vimentina (Gould y col., 1990a). Todos estos resultados responderían a un desarrollo enlentecido del hipocampo cuando existe un déficit de HT, y a una maduración más rápida en el caso de existir un exceso de HT, aunque no se ha podido demostrar un efecto directo de la T3 sobre la maduración de la astrogía. Son probablemente las interrelaciones neurona-glía las que determinan parte del comportamiento de los astrocitos en situaciones de daño cerebral producido por la carencia de HT. Para apoyar esto, tenemos el ejemplo del cerebelo, donde la respuesta de los astrocitos al déficit de HT es distinta que en el hipocampo (Clos y col., 1973; Clos y col., 1982; Faivre-Sarrailh y col., 1991), ya que en el cerebelo de ratas hipotiroides aumenta el número de astrocitos y también de sus procesos como consecuencia de que en esta estructura hay un incremento de muerte celular originada por el hipotiroidismo (Lewis y col., 1976; Rabie y col., 1977). En el hipocampo en cambio, no parece existir un incremento de muerte celular. La distinta respuesta glial que se observa al déficit de HT en cerebelo e hipocampo se puede deber en mi opinión a tres

razones: la primera es la que acabamos de mencionar, es posible que la respuesta glial ante la falta de HT puede ser un efecto indirecto que se derive del microentorno neuronal en el cual se hallan los astrocitos, que se comportan en función del daño ocasionado por el hipotiroidismo a las neuronas y a sus conexiones. Otra segunda razón es que pudieran existir diferentes subtipos de astrocitos con propiedades diferentes en distintas zonas del cerebro. La tercera razón pudiera ser la influencia de otros factores ya sean hormonales o no, que pudieran responder de modo local en las diferentes estructuras del cerebro a la falta de HT. Un ejemplo de ello es que el hipertiroidismo origina un incremento en el número de receptores para glucocorticoides en el hipocampo (Meaney y col., 1987), conociéndose además un efecto de los glucocorticoides sobre la expresión de GFAP en hipocampo (O'Callaghan y col., 1991).

### **5.3. Evolución de la glía radial en edad fetal y neonatal en la corteza cerebral de ratas controles (C, LI) e hipotiroideas (L, LP, y MMI)**

Otro de los objetivos de este trabajo fue el estudiar como afectan las DPY y el MMI a la glía radial en la corteza cerebral, lo que nos puede dar una idea de como se encuentran en las ratas tratadas las supuestas vías de migración que utilizan las neuronas post-mitóticas para encontrar sus posiciones definitivas en la corteza cerebral (Rakic, 1972 y 1981; Caviness, 1989). Al contrario de lo que sucede en el hipocampo, donde no se observa una disminución de fibras gliales “inmaduras” marcadas con el anticuerpo RAT-401, nosotros hemos encontrado que el hipotiroidismo inducido por el MMI afecta severamente al número de fibras gliales que contienen el filamento intermedio nestina en la corteza cerebral, y que el hipotiroidismo inducido por las DPY no influye en ninguna de las tres edades estudiadas (E-21, P-5, P-10). Según se muestra en la tabla 1 y en la figura 14, existe en E-21 una cantidad significativamente menor de glía radial formada en la corteza superficial y en la corteza profunda de ratas MMI con respecto a ratas LP y controles (C y LI). En E-21 no hemos encontrado apenas expresión de GFAP en la

corteza visual en ninguna de las condiciones estudiadas, lo que indica un periodo más tardío en la expresión de este marcador característico de astroglia, con respecto al hipocampo. La causa puede ser que en la corteza cerebral la expresión de GFAP se produzca más tarde porque la migración de las jóvenes neuronas que han sido generadas en la zona ventricular, no se completa aproximadamente hasta P-6 (Hicks y D'Amato, 1968; Miller, 1988), mientras que en el hipocampo la migración de las neuronas piramidales del área CA1 ha sido completada en E-21 (Altman y Bayer, 1990b). Es lógico pensar que en la última etapa de migración neuronal, las fibras de glía radial comiencen a expresar GFAP como paso previo a su transformación en astrocitos. La cantidad de GFAP y el periodo en el que se va a expresar esta proteína en la glía radial puede variar, como ya hemos visto, dependiendo de la estructura de que se trate, pero también dependiendo de la especie animal, ya que hay autores que muestran que en el gato y en el ratón, la glía radial no reacciona con anticuerpos contra la GFAP (Silver y col., 1993) y por el contrario sí se marcan y en número superior a la rata las fibras de GFAP en la corteza cerebral del mono y en el hombre (Antanitus y col., 1976; Levitt y Rakic, 1980).

En P-5 sí observamos marcaje de GFAP (figura 16), y ya podemos ver que en la corteza cerebral existe suficiente expresión de GFAP como para llevar a cabo una cuantificación. Si atendemos solamente al marcaje obtenido con RAT-401 (tabla 1, figuras 14 y 15) parece que existe una recuperación debido a que la cantidad de fibras es similar en las cuatro condiciones (C, LI, LP y MMI), pero el marcaje que obtenemos para GFAP nos indica que el enlentecimiento en la maduración de la glía y en la expresión de GFAP que habíamos visto en el apartado anterior en el hipocampo de animales hipotiroideos, también se produce en la corteza profunda de ratas MMI. Vemos por tanto que en corteza superficial y en corteza profunda de ratas P-5 tratadas con MMI existe el mismo número de fibras inmunomarcadas con RAT-401 que en los animales C. Sin embargo hay una cantidad mucho menor de fibras gliales, que pueden ser identificadas con anti-GFAP en la corteza profunda de ratas MMI (tabla 2, figuras 16 y 17). Esta menor cantidad de fibras GFAP en los animales tratados con MMI, implica quizás que la transformación en astrocitos se va a producir en estas ratas más tardíamente, lo que coincide con otros autores que sugieren que hay una disminución en la inmunoreactividad



para GFAP en la corteza cerebral de ratas hipotiroideas durante el desarrollo neonatal (Granholm y col., 1985; Kalman y col., 1991), y que en ratones hipotiroideos a los que se les ha producido experimentalmente una lesión cerebral, sufren un retraso en la expresión de GFAP en astrocitos reactivos (Miyake y col., 1989). Por el contrario, algunos autores sostienen que el hipotiroidismo no provoca ni retraso ni disminución en la expresión de GFAP en la corteza cerebral (Patel y col., 1989) y encuentran más astrocitos GFAP inmunoreactivos en el giro cingulado de ratas hipotiroideas en P-15 con respecto a controles. Tanta controversia puede ser debida a la estrategia utilizada en el conteo, a la zona de la corteza donde se cuantificó y al grado de hipotiroidismo de los animales estudiados.

En P-10 obtenemos más datos que confirman el retraso en la evolución de la glía radial en ratas MMI (tabla 1, figuras 14 y 18), ya que encontramos un número significativamente mayor de fibras marcadas con RAT-401 en corteza superficial y en corteza profunda. En las figuras 18a y 18b se muestra claramente como la glía radial está en fase de desaparición mientras en la figura 18c se puede apreciar que todavía se conservan muchas fibras que contienen nestina en las ratas MMI. Un caso similar de expresión de proteínas gliales constituyentes del citoesqueleto que son anormalmente expresadas cuando ya deberían estar presentes en poca cantidad o haber desaparecido, es observado en el cerebelo de ratas tratadas con PTU, en donde existe un marcado retraso en la desaparición de vimentina (Faivre-Sarrailh y col., 1991).

Los datos procedentes de ratas MMI indican claramente que existe un retraso en la formación, y posterior maduración de la glía radial en el área visual de la corteza cerebral: en E-21 existen menos procesos gliales marcadas con RAT-401 en corteza superficial y profunda, en P-5 encontramos menos procesos GFAP inmunoreactivos en corteza profunda, y en P-10 hay más glía radial positiva para RAT-401 en corteza superficial y profunda. En ratas LP en cambio no encontramos ninguna alteración en la glía radial (tablas 1 y 2, figuras 13 a 18). La causa pudiera deberse a que en los primeros 10 días neonatales existe una cantidad de T4 similar a los controles y lo que es más, la concentración de T3 en el cerebro de ratas LP en P-5 llega a alcanzar un valor superior

al de las ratas C ( $1255 \pm 174$  pg/g en LP y  $854 \pm 85$  pg/g en C). Con este mecanismo de control de HT a nivel cerebral que tienen las ratas LP durante los primeros días postnatales resulta difícil que se pueda observar cualquier tipo de cambio a nivel morfológico y si ha ocurrido algún tipo de alteración en estas ratas en la migración neuronal es más lógico que haya ocurrido en el periodo fetal.

Si el hipotiroidismo inducido por MMI vemos que causa un retraso en la expresión de GFAP y en la desaparición de la glía radial, hay también otros muchos factores que pueden actuar en el SNC y que tienen efectos conocidos o bien sobre la glía radial o sobre la génesis de astrocitos y la cantidad de GFAP. En ratas neonatales tratadas con etanol se produce una desaparición prematura de la glía radial en la corteza cerebral (Miller y Robertson, 1991) y un aumento significativo en la aparición de astrocitos GFAP inmunoreactivos, que se mantiene en el tiempo (Miller y Robertson, 1991; Goodlet y col., 1993). La progesterona y el 17-beta-estradiol provocan un aumento de la densidad superficial de astrocitos GFAP inmunoreactivos en el hipocampo de ratas ovariectomizadas (Luquin y col., 1993). Los glucocorticoides por el contrario disminuyen la cantidad de GFAP en la corteza cerebral y en el hipocampo de ratas adrenalectomizadas (O'Callaghan, 1991). Siendo conocedores de la influencia que tienen éstos y otros factores sobre la astroglia debemos de tener en cuenta, como ya hemos mencionado en el caso del hipocampo, que durante el desarrollo del SNC se pueden producir interacciones de las HT con otras hormonas y factores de crecimiento, las cuales no podemos controlar en nuestros modelos experimentales *in vivo* y que nos sugieren que cuando hay déficit de HT, los efectos que se observan sobre la glía radial y la expresión de GFAP en la corteza pudieran deberse por un lado a efectos indirectos que se derivan de la acción de las HT sobre otras células nerviosas y por otro, a la interacción de las HT con otros esteroides o señales hidrofóbicas. Varios aspectos moleculares acerca de la acción de la T3 sobre sus receptores nucleares apoyan la idea de un efecto indirecto de las HT sobre la astroglia y sus precursores, ya que el receptor de HT más abundante en astrocitos es el de tipo alfa-2 (Leonard y col., 1994), pero este tipo de receptor no es capaz de unir T3 (Thompson y col., 1987; Izumo y Madavi, 1988; Lazar y col., 1988). ¿Cómo podría la T3 ejercer una acción directa sobre el DNA en unas células cuyo

receptor más abundante para T3 no es capaz de unir ligando?. Además sabemos que los receptores nucleares de HT pertenecen a la misma superfamilia que los receptores de esteroides, vitamina D y ácido retinoico (para revisión ver Evans, 1988), que es posible la unión de un tipo de receptor en el DNA a diferentes elementos de respuesta, y también la formación de heterodímeros entre subunidades de receptores para distintas moléculas hidrofóbicas (para revisión ver Lopes da Silva y col., 1995). La idea de una interacción de las HT con otros esteroides o moléculas lipofílicas en las células gliales parece bastante aceptable, aunque por el momento resulta imposible de explicar cómo sucede.

#### **5.4. Estudio de la formación de capas corticales en el área visual de ratas controles (LI) e hipotiroideas (LP)**

En nuestro conocimiento este estudio es el primero realizado sobre la histogénesis de la corteza cerebral de ratas hipotiroideas a consecuencia de DPY. Este trabajo unido a los estudios realizados en la glía radial en ratas tratadas con DPY y en ratas tratadas con MMI nos permitieron determinar que sucedía en la fase de génesis neuronal y posteriormente en la etapa de migración. Los estudios clásicos realizados en la capa granular externa del cerebelo y en la zona ventricular de la corteza cerebral por Lewis y col. (1976) indicaban que no existía ningún tipo de alteración en ratas tratadas con PTU ni en la longitud del ciclo celular, ni en la duración de las distintas fases del ciclo.

Nuestra intención fue la de estudiar la distribución de las neuronas en la corteza visual inyectando timidina tritiada los días embrionarios en que se generan la mayor parte de las neuronas que van a formar la capa V y sacrificando posteriormente en P-22. Posteriormente estudiamos la distribución de las neuronas que habían sido marcadas no sólo en la capa V, sino en todas las capas corticales. Las edades de inyección elegidas fueron E-16 y E-17 (Bayer y Altman, 1991; Ignacio y col.; 1995). El método que utilizamos para marcar las neuronas que se hallaban en su última división mitótica fue el

de realizar una sola inyección en la edad embrionaria que queríamos estudiar, en lugar del método de acumulación de marcaje con sucesivas inyecciones en un día embrionario empleado normalmente por Bayer y Altman (1991). Consideramos que una única inyección en el día embrionario, junto con el criterio de considerar como positivas sólo las neuronas fuertemente marcadas, era el método más sencillo a nivel experimental y que nos permitía hacer comparaciones entre distintos grupos de animales.

De un modo general no hemos observado anomalías en la distribución de neuronas marcadas en ratas LP, ni en las ratas inyectadas en E-16 (tabla 3, figura 24), ni en aquellas inyectadas en E-17 (tabla 4, figura 24). Unicamente se ha observado que cuando la inyección se realizó en E-16, en las ratas LI el mayor porcentaje de neuronas marcadas es encontrado en la capa VI, mientras que en las ratas LP el mayor porcentaje es encontrado en capa V. Este desplazamiento que existe entre ratas LI y ratas LP en la capa que contiene el máximo porcentaje de neuronas marcadas en E-16 puede ser debido como mencionamos en resultados (apartado 4.5) al periodo de cruce de las hembras con los machos, que fue de 12 horas, con lo que es importante que seamos conscientes de que puede haber una variación de 12 horas en la determinación exacta del día embrionario. Este tiempo es importante dado el rápido desarrollo del SNC de la rata en este periodo. Por todo ello creemos que esas diferencias no son debidas a la condición experimental de cada grupo.

La interpretación más probable de este resultado es que no existe una anormal distribución laminar de las neuronas generadas en E-16 y en E-17 en la corteza cerebral de ratas LP. Para apoyar estos datos tenemos los obtenidos en los experimentos de marcaje de glía radial con anticuerpos contra la GFAP y la nestina (figuras 14 y 17) en los que no observamos diferencias en la cantidad y disposición de glía radial en ratas LP. Parece ser por tanto que en las ratas LP, la red glial con la que interaccionan las neuronas postmitóticas se halla intacta, lo que facilita el proceso de migración de éstas. Si aparentemente no difiere la distribución de las neuronas marcadas en las ratas entre ambas condiciones experimentales estudiadas, lo que sí varía significativamente es el número de neuronas marcadas en E-16 y en E-17 en ratas LP con respecto a ratas LI

(figura 22). Este número de neuronas marcadas es menor en las ratas LP cuando la inyección se realiza en E-16 y sobre todo en E-17. Esto induce a pesar que en ratas LP, la deficiencia tiroidea ocasionada por la carencia de yodo ha influido negativamente en el proceso de división de los neuroblastos en la zona ventricular de la corteza cerebral, lo que ha originado finalmente un número menor de neuronas generadas. Sin embargo el número de neuronas teñidas en P-22 con tionina por el método de Nissl en cada capa cortical de las ratas LP es similar al número de neuronas que tenemos también teñidas en las distintas capas de las ratas LI (tabla 5, figura 23). El que no hayamos encontrado diferencias en el número de neuronas en P-22 entre los dos grupos, coincide con otros autores, quienes tampoco observan una disminución en la cantidad de neuronas presentes en la corteza cerebral de ratas neonatales tratadas con PTU (Benham-Rassoli y col., 1991).

Lo que no debemos descartar es que las HT estén implicadas de alguna forma en el proceso de neurogénesis; un ejemplo de esto es la gran concentración de receptores tiroideos en el feto humano en el periodo de multiplicación de neuroblastos (Bernal y Pekonen; 1984). Para explicar los resultados que hemos obtenido en este estudio se plantean dos posibilidades: la primera posibilidad es que en las ratas LP muchas de las neuronas destinadas a una capa determinada han alcanzado su última mitosis en una edad embrionaria que no se corresponde con la posición que ocupan en la corteza. Por ejemplo, en las ratas LI hemos marcado radiactivamente en E-16 y en E-17 el 45% de las neuronas que posteriormente han formado la capa V, mientras que en las ratas LP sólo hemos marcado el 29%. Quizás esta diferencia de un 26 % de neuronas de capa V que no hemos conseguido marcar en las ratas LP, ni en E-16, ni en E-17, se deba a que estas neuronas se han generado en otra edad embrionaria y por lo tanto no las hemos podido detectar como marcadas en nuestro estudio.

La segunda posibilidad que hay que considerar es que se altere de alguna forma la duración de alguna de las etapas del ciclo celular en la zona ventricular en las ratas LP. Una disminución en la duración de la fase de captación de timidina tritiada



se reflejaría en un menor número de neuronas radiactivamente marcadas, por lo que una disminución en la longitud de la fase S explicaría que el tanto por ciento de neuronas marcadas radiactivamente sea menor en las ratas LP. Lewis y col. (1976) no encontraron diferencias en ninguna de las fases del ciclo celular, pero recientemente se ha demostrado en cultivos de neuroblastos de pollo que la T3 estimula la incorporación de timidina tritiada y si se coloca una sonda antisentido para el RNAm de los receptores de tipo alfa se inhibe de forma significativa esta incorporación de timidina tritiada por parte de los neuroblastos (Lezoualc'h y col., 1995). La utilización de una sonda contra los receptores de tipo beta no tienen en cambio ningún efecto sobre la captación de timidina tritiada en estas células. Por lo tanto los receptores de tipo alfa parecen unos buenos candidatos a actuar en la fase de proliferación en contra de lo que sugieren Bradley y col. (1992), los cuales piensan que este tipo de receptores están más implicados en la diferenciación. Los mecanismos moleculares por los cuales los receptores de hormonas tiroideas podrían actuar en la fase de proliferación o de diferenciación todavía se desconocen, incluso es reciente el estudio de como interaccionan otras moléculas que son candidatas a regular una u otra fase. Un ejemplo de una de estas moléculas es el factor de transcripción BF-1 (factor cerebral 1), que actúa en la fase de proliferación en la zona ventricular, posiblemente aumentando la respuesta de las células neuroepiteliales a los mitógenos (Xuan y col., 1995). También se sabe que hay factores tróficos que lo que hacen es estimular la diferenciación de las células progenitoras, como el caso de NT-3, la que aún en presencia del mitógeno bFGF (factor de crecimiento básico de fibroblastos) es capaz de inducir la diferenciación a neuronas (Ghosh y Greenberg., 1995).

No se llevó a cabo el estudio de la influencia del MMI en la neurogénesis de la zona ventricular por el hecho de que otro grupo estaba llevando a cabo un trabajo similar en la corteza auditiva en el momento que nosotros íbamos a comenzar este trabajo (Lucio y col., 1996). Estos autores muestran una distribución anormal en la corteza auditiva de ratas postnatales que han sido tratadas con MMI en las cuales hay un incremento significativo en el tanto por ciento de neuronas marcadas en la sustancia blanca con

respecto a controles cuando se inyecta sucesivamente BrdU los días E-14, E-15 y E-16. También se observa un ligero incremento de neuronas marcadas en las capas V y VI cuando las inyecciones de BrdU se realizan sucesivamente en E-17, E-18 y E-19. Nosotros hemos demostrado que existe un retraso en la formación y maduración de la glía radial en la corteza cerebral de ratas MMI que puede explicar por tanto la distribución anormal que Lucio y col. encuentran. Además también hemos mostrado que en la corteza cerebral de las ratas LP, la glía radial no está deteriorada y por tanto nosotros no hemos encontrado una distribución laminar alterada en las ratas LP.

#### **5.5. Desarrollo de la mielinización en el estriado de ratas controles (C, LI) e hipotiroideas (LP, MMI).**

Uno de los efectos más severos del hipotiroidismo neonatal es una disminución en el contenido de mielina. La cantidad de lípidos presentes en las vainas de mielina se reduce (Walravens y Chase, 1969; Flynn col., 1977; Bhat y col., 1981), así como la actividad de ciertas enzimas responsables de la síntesis de lípidos de mielina (Bhat y col., 1979). La célula O-2A, precursora de los oligodendrocitos, puede proliferar sin diferenciarse en respuesta a señales procedentes de los astrocitos (Noble y Murray, 1984) o con una combinación del factor de crecimiento derivado de plaqueta (PDGF), NT-3 y el factor de crecimiento insulínico I (IGF-1) (Barres y col., 1994a). Se ha propuesto recientemente que las HT juegan un papel contrario a estos factores, sugiriendo que las HT, y también el ácido retinoico y los glucocorticoides, provocan en presencia de mitógenos en el medio de cultivo que el precursor del oligodendrocito abandone el ciclo celular, una vez que ha completado un número determinado de divisiones, quizás por inhibición de factores de transcripción AP-1 (Barres y col., 1994b). Se cree por tanto que existe un efecto de las HT sobre la diferenciación de los oligodendrocitos, se conoce que éstas afectan la síntesis de las proteínas de la vaina de mielina, y además se han identificado los cuatro tipos de receptores tiroideos en los oligodendrocitos (Carlsonn y

col., 1994). Parece por tanto un tipo de células muy adecuadas para estudiar los efectos *in vivo* del déficit de HT. Para ello hemos elegido como marcador la MBP, la cual se empieza a expresar en cuanto el oligodendrocito se ha diferenciado, muy poco tiempo antes de comenzar la mielinización.

Una estructura que contiene un gran número de fibras mielinizadas, en la cual nos pareció que era viable llevar a cabo una cuantificación inmunohistoquímica es el estriado. Esta estructura se cree que está implicada en la patología del cretinismo neurológico; se ha asociado la deficiencia motora observada en estos individuos con una lesión de los ganglios basales (DeLong, 1989). A nivel molecular se ha observado también en el estriado una reducción significativa en la expresión del gen neuronal RC3 en ratas y cabras hipotiroideas (Muñoz y col., 1991, Piosik y col., 1995)

En las figuras 25 a 28 se muestra la evolución del marcaje para MBP desde P10 hasta P-32 en el estriado de ratas C, LP y MMI. Según se observa no se localiza marcaje en los somas de los oligodendrocitos en ninguna de las edades estudiadas, lo que está de acuerdo con Reynolds y Wilkin (1988) quienes *in vivo* no observan marcaje para MBP en los somas celulares, aunque sí lo observan en el soma en oligodendrocitos en cultivo (Hardy y Reynolds, 1991). El marcaje que hemos encontrado, según nuestra opinión, corresponde de forma mayoritaria a los axones que forman la cápsula interna, sin descartar claro está, las aferentes que hacen sinapsis en las neuronas estriatales y las eferentes que parten desde el estriado hacia otras estructuras. En edad embrionaria, las primeras proyecciones corticales procedentes de la subplaca van a empezar a formar la cápsula interna (McConnell y col., 1989; De Carlos y O'Leary, 1992). Por otra parte, los axones talámicos son los primeros en alcanzar la corteza cerebral y van a establecer junto con los axones de la subplaca y desde direcciones opuestas la cápsula interna. Finalmente esta vía axonal será completada con las proyecciones a estructuras subcorticales procedentes de neuronas de las capas V y VI. Las neuronas de la capa VI enviarán sus axones al tálamo, mientras que las neuronas de la capa V van a proyectar a múltiples lugares del mesencéfalo, rombencéfalo y médula espinal (Jones, 1984).

Según los resultados obtenidos en el presente trabajo, en el estriado de ratas LP y MMI se observó una disminución de la densidad superficial de procesos MBP inmunoreactivos, pertenecientes probablemente a los axones de la cápsula interna, en varias de las edades postnatales estudiadas (tabla 6). Esta disminución fue significativa en P-10 y en P-15 en las ratas LP, y en P-10, en P-15 y en P-20 en las ratas MMI, lo que indica un efecto más severo del tratamiento con MMI y una recuperación más tardía de los niveles normales de MBP si consideramos el estriado de forma global. En las ratas MMI a los 20 días de edad postnatal, como se puede observar en las figuras 8 y 9, la T3 es solamente algo más baja que en las ratas C y pudiera provocar que la cantidad de MBP alcance valores normales a partir de P-20. Por otra parte, el aumento de T3 que se produce en la primera semana postnatal en ratas LP, periodo en el que ya es detectado el RNAm de la MBP (Barbaresse y col., 1978), parece ser suficiente para que apenas podamos encontrar efectos en las ratas LP. Según esta interpretación, en las primeras fases de la mielinización, la T3 resulta indispensable para la correcta expresión de las proteínas de mielina; posteriormente, otros factores podrían estimular la transcripción de MBP en ausencia de T3 y por eso no podemos detectar apenas deterioro en la mielinización de ratas LP. Uno de esos hipotéticos factores podría ser por ejemplo el ácido retinoico, cuyo receptor ya habíamos mencionado que es capaz de ligarse a los TRE de los receptores tiroideos.

Estos efectos que nosotros hemos encontrado en las primeras fases de la mielinización en el estriado, se aproximan bastante a los encontrados por Rodríguez-Peña y col. (1993) para la expresión MAG en el estriado de ratas tratadas con MMI, quienes encuentran una recuperación de los valores de esta otra proteína entre P-25 y P-30. Otros autores han descrito una disminución del RNAm de la MBP en el cerebelo de ratas tratadas con PTU solamente en las primeras fases de la mielinización, concretamente en P-10, con una posterior recuperación de los niveles (Figueiredo y col., 1993). Por el contrario Farsetti y col. (1991) habían encontrado que el hipotiroidismo provocaba una disminución en la cantidad del mRNA de la MBP en cerebro, y que no existía tal recuperación ni siquiera en P-60. La extracción del RNA fue realizada por Farsetti y col. a partir de cerebro total, por lo que quizás esta normalización que encontramos nosotros

durante el desarrollo en el estriado y Figueiredo y col. en el cerebelo no puede ser detectada según su procedimiento. También es posible que en algunas zonas del cerebro exista recuperación de los niveles de las proteínas de mielina durante el desarrollo y en otras zonas como por ejemplo en la corteza cerebral no haya tal recuperación. Este es el caso de MAG, cuya expresión sigue alterada en la corteza cerebral de ratas hipotiroideas incluso en P-30 (Rodríguez-Peña y col., 1993).

Los efectos de la falta de HT sobre la cantidad de MBP han variado, según se trate de la zona lateral o medial del estriado (tabla 7), la reducción en la densidad superficial se puede observar en ratas LP solamente en P-10 en la zona lateral. En ratas MMI el efecto es más pronunciado, la disminución de la densidad superficial se produce desde P-10 hasta P-15 en la zona medial, y desde P-10 hasta P-20 en la zona lateral. Dentro de la zona lateral, la parte más afectada en ratas MMI es la VL, en la que no hemos observado una total recuperación ni siquiera en P-32 (tabla 8). Respecto a la circuitería del estriado, la zona DL parece estar relacionada con el sistema sensorimotor y la zona VM lo está más con el sistema límbico (Nauta y Domesick, 1984). Las zonas VL y DM se podrían asociar también con el sistema límbico (Gimenez-Amaya, comunicación personal). Aunque no se puede demostrar mediante este tipo de experimentos inmunocitoquímicos si el MMI ha tenido más efecto en el estriado sobre el sistema sensorimotor o el sistema límbico, ya que lo que marcamos nosotros mayoritariamente son axones que no realizan sus conexiones en el estriado y pertenecen a la cápsula interna, sin poder precisar además a que estructura se dirigen de forma específica, nosotros estamos comparando las diferencias que existen en la expresión de MBP en una zona determinada del cerebro, y son por ejemplo los oligodendrocitos que se hallan en la zona VL los responsables de formar las vainas de mielina en esa zona, independientemente de donde tengan sus conexiones las proyecciones que atraviesan la zona VL; sabemos que la expresión de MBP es regulada neonatalmente por T3 a nivel pre-transcripcional (Farsetti y col., 1991) y a nivel post-transcripcional (Matthieu y col., 1990; Tosic y col., 1992), y por tanto que la densidad superficial de procesos MBP marcados en la zona VL dependerá de la disponibilidad de T3 que tengan los oligodendrocitos en dicha zona y que con un estudio histológico y a la vez cuantitativo



como el que hemos realizado podemos obtener una información muy detallada de como se comportan diversas estructuras cerebrales ante ciertas patologías o factores externos, en este caso ante la carencia de HT.

## CONCLUSIONES

1. No hubo ningún efecto significativo sobre el peso corporal de los animales tratados con DPY. Por el contrario, el tratamiento con MMI provocó un descenso del peso corporal con respecto a los animales controles en todas las edades estudiadas.
2. En edad fetal, el tratamiento con MMI o con DPY disminuye de forma significativa los niveles de T3 y T4 en cerebro con respecto a los controles. Durante las primeras fases de desarrollo neonatal el MMI produce una disminución mayor y más prolongada de los niveles de T3 y T4 en cerebro que las DPY. No obstante, en los animales mantenidos a DPY, los niveles cerebrales de T3 se vuelven a reducir significativamente a partir de P-10.
3. En ninguno de los parámetros morfológicos estudiados existen diferencias entre las ratas C y las ratas LI por lo que la suplementación con yoduro que realizamos en las DPY ha sido suficiente para evitar alteraciones durante el desarrollo del SNC de la rata.
4. No existen diferencias en el área CA1 de hipocampo de ratas E-21 en la cantidad de procesos marcados con el anticuerpo RAT-401 en ninguna de las condiciones experimentales. Esto indica que en esta edad embrionaria la proliferación de este tipo de células gliales no está afectada ni por el tratamiento con MMI, ni por las DPY.
5. Las ratas L, LP y las ratas MMI presentan a los 21 días de edad embrionaria un número menor de procesos gliales inmunoreactivos para GFAP en el área CA1 de hipocampo que sus controles (C y LI). Esta menor cantidad de glía radial que contiene GFAP indica que los tres tipos de tratamiento utilizados en edad fetal han provocado un retraso en la expresión de este filamento intermedio y por tanto en la maduración de las fibras gliales del hipocampo.

6. El tratamiento con MMI produce una disminución del número de fibras de glía radial “inmadura” en la corteza cerebral de ratas E-21 y un retraso en la desaparición de estas fibras en P-10, además de una menor cantidad de glía radial que está expresando GFAP en P-5. Todo ello indica que existe un retraso en la evolución de la glía radial, lo que podría provocar una alteración de la migración neuronal en la corteza cerebral.

7. Al contrario que lo observado en ratas MMI, no hay ningún efecto en la corteza cerebral en la distribución y evolución de la glía radial en las ratas LP en edad fetal y neonatal (E-21, P-5 y P-10). La expresión de GFAP no mostró ninguna alteración en P-5, ni tampoco la desaparición programada de la glía radial en la corteza.

8. La cantidad de neuronas cuantificadas en ratas P-22 en las distintas capas corticales, teñidas por el método de Nissl, es similar en ratas LI y en ratas LP. Sin embargo el número de neuronas generadas en la corteza cerebral en E-16 y en E-17, marcadas con timidina tritiada, es menor en las ratas LP.

9. Existe una disminución de la densidad superficial de procesos MBP inmunoreactivos en el estriado de ratas MMI respecto a controles en P-10, P-15 y P-20. Desde P-20 hasta P-32 se produce una recuperación en los niveles de expresión de MBP en estas ratas, a pesar del tratamiento con MMI.

10. Existe una disminución de la densidad superficial de MBP en el estriado de ratas LP respecto a controles en P-10 y P-15. La recuperación de los niveles de MBP en estas ratas LP tiene lugar varios días antes que en las ratas MMI, sucediendo entre P-15 y P-20.

11. La expresión de MBP ha sido más afectada por el déficit de HT en la zona lateral del estriado, tanto en ratas MMI, como en ratas LP.

## BIBLIOGRAFIA

Abrams, G.M., Larsen, P.R. (1973) Triiodothyronine and thyroxine in the serum and thyroid glands of iodine deficient rats. *J. Clin. Invest.* 52: 2522-2531.

Aizenman, Y. y De Vellis, J. (1987) Synergistic action of thyroid hormone, insulin and hydrocortisone on astrocyte differentiation. *Brain Res.* 414: 301-308.

Altman, J. y Bayer, S. (1990a) Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and multiple germinal sources of dentate granule cells. *J. Comp. Neurol.* 301: 325-342.

Altman, J. y Bayer, S. (1990b) Prolonged sojourn of developing pyramidal cells in the intermediate zone of the hippocampus and their settling in the stratum pyramidale. *J. Comp. Neurol.* 301: 343-364.

Altman, J. y Bayer, S. (1990c) Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursor during the perinatal and postnatal periods. *J. Comp. Neurol.* 301: 365-381.

Andres-Barquin, P.J., Fages, C., Le Prince, G., Rolland, B. y Tardy, M. (1994) Thyroid hormones influence the astroglial plasticity: changes in the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and of its encoding message. *Neurochem. Res.* 19: 65-69.

Angevine, J.B. y Sidman, R.L. (1961) Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* 192: 766-768.

Aniello, F., Couchie, D., Bridoux, A.M., Gripos, D. y Nunez, J. (1991) Splicing of juvenile end adult tau mRNA variants is regulated by thyroid hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 4035-4039.

Antanitus, D.S., Chol, B.H. y Lapham, L. (1976) The demonstration of glial fibrillary acidic protein in the cerebrum of the human fetus by indirect immunofluorescence. *Brain Res.* 103: 613-616.

Balazs, R., Brooksbank, B.W.L., Davison, A.N., Eayrs, J.T. y Wilson, D.A. (1969) The effect of neonatal thyroidectomy on myelination in the rat brain. *Brain Res.* 15: 219-232.

Barbaresse, E., Carson, J.H., y Braun, P.E. (1978) Accumulation of the four myelin basic protein proteins in mouse brain during development. *J. Neurochem.* 31: 779-782.

Barres, B.A., Raff, M.C., Gaese, F., Bartke, I., DeChant, G. y Barde, Y.A. (1994a) A crucial role for neurotrophin-3 in oligodendrocyte development. *Nature* 367: 371-375.

Barres, B.A., Lazar, M.A. y Raff, M.C. (1994b) A novel role for thyroid hormone, glucocorticoids and retinoic acid in timing oligodendrocyte development. *Development* 120: 1097-1108.

Bayer, S.A. y Altman, J. (1991) *Neocortical development*. Raven Press, New York.



- Benham-Rassoli, M., Herbert, L., Howard, V., Pharoaph, P. y Stanisstreet, M. (1991) Effect of propylthiouracil treatment during prenatal and early postnatal development on the neocortex of rat pups. *Neuroendocrinology* 53: 321-327.
- Bernal, J. y Pekonen, F. (1984) Ontogenesis of the nuclear 3,5,3'-triiodothyronine receptor in the human fetal brain. *Endocrinology* 114: 677-679.
- Berry, M. y Rogers, A.W. (1965) The migration of neuroblasts in the developing cerebral cortex. *J Anat* 99: 691-709.
- Bhat, N.G., Subba Rao, G. y Pieringer, R.A. (1979) Investigations myelination in vitro: regulation of sulfolipid synthesis by thyroid hormone in cultures of dissociated cells from embrionic of dissociated cells from embryonic mice. *J. Biol. Chem.* 254: 9342-9244.
- Bhat, N.G., Sarlieve LL., Subba Rao G, y Pieringer R.A. (1981) Investigations myelination in vitro: regulation by thyroid hormone in cultures of dissociated cells from embrionic of dissociated cells from embryonic mice. *J. Biol. Chem.* 256: 1167-1171.
- Boison, D., Bussow, H., D'urso, Muller, H.W. y Stoffel, W. (1995). Adhesive properties of proteolipid protein are responsible for the compaction of CNS Myelin Sheaths. *J. Neurosci.* 15: 5502-5513.
- Bonet, B. y Herrera, E. (1988) Different responses to maternal hypothyroidism during the first and second half of gestation in the rat. *Endocrinology* 122: 450-455.
- Bradley, J.D, Towle, H.C., y Young, S. (1992) Spatial and temporal expression of alpha- and beta-thyroid hormone receptor mRNA, including the beta-2-subtype, in the developing mammalian nervous system. *J. Neurosci.* 12: 2288-2302.
- Calvo, R., Obregón, M.J., Ruiz de Oña, C., Escobar del Rey, F. y Morreale de Escobar, G. (1990) Congenital hypothyroidism as studied in rats. Crucial role of maternal thyroxine but not of 3,5,3'-triiodothyronine in the protection of the fetal brain. *J. Clin. Invest.* 86: 889-899.
- Cameron, R.S. y Rakic, P. (1991) Glial cell lineage in the cerebral cortex: a review and synthesis. *Glia* 4: 124-137.
- Carlson, D.J., Strait, K.A., Schwartz, H.L. y Oppenheimer, J.H. (1994) Immunofluorescence localization of thyroid hormone receptor isoforms in glial cells of rat brain. *Endocrinology* 135: 1831-1836.
- Caviness, V.S. jr y Sidman, R.L. (1973) Time origin of corresponding cell classes in the cerebtral cortex of normal and reeler mutant mice. *J. Comp. Neurol.* 148: 141-152.
- Caviness, V.S. jr (1989) Normal development of cerebral cortex. *Nestle Nutr Workshop Dev Neurobiol* 12: 1-8.
- Caviness, V.S. jr, Misson, J., Takahashi, T. y Crandall, J. (1989) Astroglial transformations in the developing murine cerebral wall. *Soc. Neurosci. Abstr.* 15: 328.

Chaouaha-Chekir, B., Zeghal, R. y Vigoroux, N. (1983) Effects du perchlorate administre a la mere pendant la periode d'allaitement sur le metabolisme iode du jeune rat. *Path Biol* 31: 675-677.

Chaudhury, S., Chatterjee, D. y Sarkar, P.K. (1985) Stimulation of tubuline synthesis by triiodothyronine: Dual effect of the hormone on the synthesis and turnover of the protein. *Brain Res.* 339: 191-94.

Chen, Z.P.; Chen, X.X., Dong, L., Hu, X., Zhao, W.D., Wang, D. y Ma, T. (1986) The iodine deficient rat, In: "Iodine Deficiency Disorders and Congenital Hypothyroidism". Medeiros-Neto G, Maciel RMB, Halpern A (eds) Ache Press, Sao Paulo, p 46.

Cleaver, J.E. (1967) Thymidine metabolism and cell kinetics. New York: Elsevier

Clos J., Rebiere, A. y Legrand, J. (1973) Differential effects of hypothyroidism and undernutrition on the development of glia in the rat cerebellum. *Brain Res.* 63: 445-449.

Clos, J., Legrand, Ch., Legrand, J., Ghandour, M.S., Labourdette, G., Vincendon, G. y Gombos, G. (1982) Effects of thyroid state and undernutrition on S100 protein and astroglia development in rat cerebellum. *Dev. Neurosci.* 5: 285-292.

Culican, S.M., Baumrind, N.L., Yamamoto, M. y Pearlman, A.L. (1990) Cortical radial glia: identification in tissue culture and evidence for their transformation to astrocytes. *J. Neurosci.* 10: 648-692.

De Carlos, J.A. y O'Leary, D.D.M. (1992) Growth and targeting of subplate axons and establishment of major cortical pathways. *J. Neurosci.* 12: 1194-1211.

De Groot, L.J., Larsen, P.R., Refetoff, S. y Stanbury JB (1984) The thyroid and its diseases. Willey and Sons, New York, p.57.

Delange, F.M. (1989) Endemic cretinism, an overview. En: De Long GR, Robbins J, Condliffe PG (eds) Iodine and the brain. Raven Press. New York, p. 219-229.

DeLong G.,R., (1989). Observations of the neurology of endemic cretinism. En: De Long GR, Robbins J, Condliffe PG (eds) Iodine and the brain. Raven Press. New York, p 231-238..

Derer, P. (1972). Histogénese du néocortex du Rat albinus durant la période foetale et néonatale. *Vogt, Hirnforschung*, Bd 15, Heft 1.

Dussault, J.R. y Ruel, J. (1987) Thyroid hormones and brain development. *Ann. Rev. Physiol.* 49: 321-34.

Eayrs, J.T. y Taylor, S.H.: (1951) The effect of thyroid hormone deficiency induced by methylthiouracil on the maturation of the central nervous system. *J. Anat.* 85: 350-358.

Eayrs, J.T. (1955) The cerebral cortex of normal and hypothyroid rats. *Acta Anat.* 25: 160-183.

- Eayrs, J.T. (1966) Thyroid and central nervous development. In: *The Scientific Basis of Medicine*, Ann. Rev.: 317-339.
- Eayrs, J.T. (1968) Developmental relationships between brain and thyroid. In: R.P. Michael (Ed.) *Endocrinology and human behaviour*, Oxford University Press, London: 239-255.
- Escobar del Rey F., Pastor, R., Mallol, J. y Morreale de Escobar G. (1986) Effects of maternal iodine deficiency on the L-thyroxine and 3,5,3'-triiodo-L-thyroxine contents of rat embryonic tissues before and after onset of fetal thyroid function. *Endocrinology* 118: 1259.
- Escobar del Rey, F., Mallol, J., Pastor, R. y Morreale de Escobar, G. (1987) Effects of maternal iodine deficiency on thyroid hormone economy of lactating dams pups, maintenance of normal cerebral 3,5,3'-Triiodo-L-thyroxine concentrations in pups during major phases of brain development. *Endocrinology* 21: 803-11.
- Evans, R.M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889-895.
- Faivre-Sarrailh, C., Ramie, A., Fages, C. y Tardy M. (1991) Effect of thyroid deficiency on glial fibrillary acidic protein (GFAP) and GFAP-mRNA in the cerebellum and hippocampal formation of the developing rat. *Glia* 4: 276-284.
- Farsetti, A., Mitsuhashi, T., Desvergne, B., Robbins, J. y Nikodem, V.M. (1991) Molecular basis of thyroid hormone regulation of myelin basic protein gene expression in rodent brain. *J. Biol. Chem.* 266: 23226-32.
- Fellous, A., Lennon, A.M., Francon, J. y Nunez, J. (1979). Thyroid hormones and neurotubule assembly in vitro during brain development. *Eur. J. Biochem.* 101: 365-76.
- Fierro-Benítez, R. (1986) Iodized oil and mental development. En: *Iodine deficiency disorders and congenital hypothyroidism*. Medeiros-Neto G, Maciel RBM, Halpern A (eds), Ache Sao Paulo, Brasil, p 120-126.
- Figueiredo, B.C., Almazán, G., Ma, Y., Tetzlaff, Miller F.D. y Cuello, AC. (1993) Gene expression in the developing cerebellum during perinatal hypo- and hyperthyroidism. *Mol. Brain Res.* 17: 258-268.
- Fisher, D.A., Dussault, J.D., Sack, J. y Chopra, I.J. (1977) Ontogenesis of hypothalamic-pituitary-thyroid function in man, sheep and rat. *Recent Prog. Horm. Res.* 33: 59.
- Flyn, T.J., Deshmukh, R.A. y Pieringer, RA. (1977) Effect of altered thyroid function on galactosyl diacylglycerol metabolism in myelinating rat brain. *J. Biol. Chem.* 252: 5864-70.
- Formiguera, X. y Casals, A. (1988) Antitiroideos. *Jano* 35: 57-59.
- Francon, J., Fellous, A., Lennon, AM. y Nunez, J. (1977). Is thyroxone a regulatory signal for neurotubule assembly during brain development. *Nature* 266: 188-199.

- Franklyn, J.A., Wood, D.F., Balfour, N.J., Ramsden, D.B., Docherty, K., Chin, W.W. y Shepard, M.C. (1986) Effect of hypothyroidism and thyroid hormone replacement in vivo on pituitary cytoplasmic concentrations of thyrotropin-beta and alpha-subunit messenger ribonucleic acids. *Endocrinology* 120: 2279-2288.
- Ganser, A.L. y Kirschner, D.A. (1980) Myelin structure in the absence of basic protein in shiverer mouse. In: Bauman, N. (ed.). *Neurological Mutations Affectin Myelination*, Elsevier/North Holland Biomedical Press. 171-176.
- Ghosh, A. y Greenberg, M.E. (1995) Distinct roles for bFGF and NT-3 in the regulation of cortical neurogenesis. *Neuron* 15: 89-103.
- Goodlett, C.R., Leo, J.T., O'Callaghan, J.P., Mahoney, J.C. y West, J.R. (1993) Transient cortical astrogliosis induced by alcohol exposure during neonatal brain growth spurt in rats. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 72: 85-97.
- Gould, E., Frankfurt, M., Westlind-Danielsson, A. y McEwen, B.S. (1990a) Developing forebrain astrocytes are sensitive to thyroid hormone. *Glia* 3: 283-292.
- Gould, E., Mark, D. y McEwen, S. (1990b) Dendritic spine density of adult hippocampal is sensitive to thyroid hormone. *Brain Res.* 525: 327-329.
- Gould, E., Woolley, S. y McEwen, S. (1991). The hippocampal formation: morphological changes induced by thyroid, gonadal and adrenal hormones. *Psychoneuroendocrinol.* 16: 67-84.
- Granholm A.Ch., Dahl D., Siegel R.A., Bjorkhend, B. y Seiger A. (1985) Delayed development of GFA immunoreactivity in the parietal cortex during thyroid hormone deficiency. *Int. J. Dev. Neurosci.* 3: 149-156.
- Gravel, C. y Hawkes, R. (1990) Maturation of the corpus callosum of the rat. I. Influence of thyroid hormones on the topography of callosal projections. *J. Comp. Neurol.* 291: 128-146.
- Gressens, P., Kosofsky B.E. y Evrard, P. (1992) Cocaine-induced disturbances of corticogenesis in the developing murine brain. *Neurosci. Letters* 140: 113-116
- Gutiérrez, R., Boison, D., Heinemann, U. y Stoffel, W. (1995) Decompaction of CNS myelin leads to a reduction of the conduction velocity of action potentials in optic nerve. *Neurosci. Letters* 195: 93-96.
- Hamburgh, M. (1969) The role of thyroid and growth hormone in neurogenesis. En: Moscona AA., Monroy A (eds). *Current topics in developmental biology*, Academic Press. New York, vol 4: 109.
- Hardy, R. y Reynolds, R. (1991) Proliferation and differentiation potential of rat forebrain oligodendroglial progenitors both in vitro and in vivo. *Development* 111: 1061-1080.



- Hébert, R., Laureau, E., Vanasse, M., Richard, J.E. y Glorieux, J. (1986) Auditory brainstem response (ABR) audiometry in congenitally hypothyroid children under early replacement therapy. *Pediatr. Res.* 20: 570-573.
- Hetzel, B.S. (1983) Iodine deficiency disorders and their eradication. *Lancet* 2: 1126-1129.
- Hicks, S.P. y D'Amato, C.J. (1968) Cell migrations to the isocortex in the rat. *Anat Rec* 160: 619-634.
- Hockfield, S., y McKay, R.D.G. (1985). Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J. Neurosci.* 5: 3310-3328.
- Ignacio, M.P.D., Kimm, E.J., Kageyama, G.H., Yu, J. y Robertson, R.T. (1995) Postnatal migration of neurons and formation of laminae in rat cerebral cortex. *Anat. Embriol.* 191: 89-100.
- Iñiguez, M.A., Rodríguez-Peña, A., Ibarrola, N., Morreale de Escobar G. y Bernal J. (1992) Adult brain is sensitive to thyroid hormone. Regulation of RC3/Neurogranin mRNA. *J. Clin. Invest.* 90: 554-558.
- Iñiguez, M.A., Rodríguez-Peña, A., Ibarrola, N., Aguilera, M., Muñoz, A. y Bernal, J. (1993) Thyroid hormone regulation of RC3, a brain-specific gene encoding a protein kinase-C substrate. *Endocrinology* 133: 467-473.
- Ipiña, S.L. y Ruiz-Marcos, A. (1986) Dendritic structure alterations induced by hypothyroidism in pyramidal neurons of the rat visual cortex. *Dev. Brain Res.* 29: 61-67.
- Ipiña, S.L., Ruiz-Marcos, A., Escobar del Rey, F. y Morreale de Escobar, G. (1987) Pyramidal cortical cell morphology studied by multivariate analysis: effects of neonatal thyroidectomy, ageing and thyroxine-substitution therapy. *Dev. Brain Res.* 37: 219-229.
- Ismail Beigi, F., y Edelman, I.S. (1971) The mechanism of calorogenic action of thyroid hormone. *J. Gen. Physiol.* 52: 710-722.
- Izumo, S., Madavi, V. (1988) Thyroid hormone receptor alpha isoforms generated by alternative splicing differentially activate myosin HC gen transcription. *Nature* 334: 539-542.
- Jones, E.G. (1984) Laminar distributions of cortical efferent cells. En: *Cerebral Cortex*, vol I. Cellular components of the cerebral cortex (Peters A., Jones EG., eds) p 521-553. New York. Plenum.
- Kalman, M., Moskovon, G.N. y Martínez, K. (1991) Development of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in thyroidectomized rats. *Mol. Chem. Neuropathol.* 15: 103-116
- Klein, R. (1980) In GN Burrow and JH Dussault (eds.) *Neonatal thyroid screening*. Raven Press. New York, p 51
- Koenig, R.J, Lazar, M.A., Hodin, R.A., Brent, G.A., Larsen, P.R., Chin, W.W. y Moore, D.D. (1989) Inhibition of thyroid hormone action by non-hormone binding c-erbA protein generated by alternative splicing. *Nature* 337: 659-651.

Koenig, M.P. (1981) In BS Hetzel and RM Smith (eds.). Fetal brain disorders- recent approaches to the problem of mental deficiency. Elsevier North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1981, p 229

Kolodny, J.M., Larsern, P.R. y Silva, J.E. (1985a) In vitro 3,5,3'-triiodothyronine binding to rat cerebro-cortical neuronal and astroglial nuclei suggest the presence of binding sites unavailable in vivo. *Endocrinology* 116: 2109-2028.

Kolodny, J.M., Leonard, J.L., Larsern, P.R. y Silva, J.E. (1985b) Studies of nuclear 3,5,3'-triiodothyronine binding in primary cultures of rat brain. *Endocrinology* 117: 1848-1857.

Lauder, J.M. y Mugnani, E. (1980) Infrapyramidal mossy fibers in the hippocampus of the hyperthyroid rat. *Dev. Neurosci.* 3: 248-265.

Lauder, J.M. (1989) Thyroid influences on the developing cerebellum and hippocampus of the rat. En: Iodine and the brain. Raven Press. New York.

Lazar, M.A., Hodin, R.A., Darling, D.S. y Chin W.W. (1988) Identification of a rat c-erbA alpha-related protein which binds deoxyribonucleic acid but does not bind thyroid hormone. *Mol. Endocrinol.* 2: 893-901.

Lechan, R.M., Yanping, Q.L., Berrodin, T.J., Davis, K., Schwartz, H., Strait, K., Oppenheimer, J.H. y Lazar, M.A. (1993) Immunocytochemical delineation of thyroid hormone receptor beta-2-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Endocrinology* 132: 2461-2470.

Legrand, J. (1979) Morphogenetic action of thyroid hormones. *Trends Neurosci.* 2: 234-36

Legrand, J. (1984) Effects of thyroid hormones on central nervous system development, in: "Neurobehavioral Teratology". J. Yanai, ed., Elsevier, Amsterdam, p. 331.

Legrand, C y Clos, J. (1991). Biochemical, immunocytochemical and morphological evidence for an interaction between thyroid hormone receptor and nerve growth factor in the developing cerebellum of normal and hypothyroid rats. *Dev. Neurosci.* 13: 382-96.

Leonard, J.L., Farwell, A.P., Yen P.M., Chin, W.W., y Stula, M. (1994) Differential expression of thyroid hormone receptor isoforms in neurons and astroglial cells. *Endocrinology* 135: 584-555.

Levitt, P. y Rakic, P. (1980) Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J. Comp. Neurol.* 193: 815-40.

Lewis, P.D., Patel, A.D., Johnson, A.L. y Balazs, R. (1976) Effect of thyroid deficiency on cell acquisition in the postnatal rat brain: a quantitative histological study. *Brain Res.* 104: 49-62.

Lezoualc'h F., Seugnet, I., Monnier, A.L., Ghysdael, J., Behr, J.P. y Demeneix, B.A. (1995) Inhibition of neurogenic precursor proliferation by antisense alpha thyroid hormone receptor oligonucleotides. *J. Biol. Chem.* 270: 12100-12108.

Lindholm, D., Castren, E., Tsoulfas, P., Kolbel, R., Berzaghi, M.P., Leingartner, A., Heisenberg, C. P., Tesarollo, L., Parada, L.P. y Thoenen, H. (1993) Neurotrophin-3 induced by triiodothyronine in cerebellar granule cells promotes Purkinje cell differentiation. *J. Cell Biol.* 122: 443-450.

Lopes da Silva, S. y Burbach, H.P. (1995) The nuclear hormone-receptor family in the brain: classics and orphans. *Trends Neurosci.* 18: 542-548.

Lucio, R.A, García, J.V., Cerezo, J.R., Pacheco, P., Innocenti, G.M. y Berbel, P. (1996) The development of auditory callosal connections in normal and hypothyroid rats. *J. Neurosci.*, aceptado en prensa.

Luquin, S., Naftolin, F. y García-Segura, L.M. (1993) Natural fluctuation and gonadal hormone regulation of astrocyte immunoreactivity in dentate gyrus. *J. Neurobiol.* 24: 913-924.

Madeira, M.D. y Paula-Barrosa, M.M. (1993) . Reorganization of mossy fiber synapses in male and female hypothyroid rats: a stereological study. *J. Comp. Neurol.* 337: 334-352

Man, E.B. y Serunian, S.A.(1976). *Am J Obstet Gynecol* 125: 949

Marchant, B., Less, F.H. y Alexander, W.D. (1978) Anti-thyroid drugs. *Pharmacol. Ther.* 3: 305-348

Martinez-Galán, J.R., Santacana Altimiras, M., Pedraza, P., Escobar del Rey, F. y Ruiz Marcos, A. (1994) Low iodine diets and the development of glial cells of the rat hippocampus. *J. Endocrinol. Invest.* Vol. 17 Suppl. 1 a 6: 112.

Masood, K., Besnard, F., Su, Y. y Brenner, M. (1993) Analysis of a segment of the human glial fibrillary acidic protein gene that directs astrocyte-specific transcription. *J. Neurochem.* 61: 160-166.

Matthieu, J.M, Roch, J.M., Torch, M., Tomic, P., Carpano, P., Insirello, L., Stella, M.G. y Honneger P. (1990). Triiodothyronine increases the stability of myelin basic protein messenger RNA in aggregating brain cell cultures. In *Regulation of Gene Expression in the Nervous System.* 59: 109-121.

McConnell, S.K., Ghosh, A. y Shat, C.J. (1989) Subplate neurons pioneer the first axon pathway from the cerebral cortex. *Science* 245: 978-982. *Science* 245: 978-982.

Meaney, M., Aitken, D. y Sapolsky, R. (1987) Thyroid hormone influence the development of hippocampal glucocorticoid receptors in the rat: a mechanism for the effects of postnatal handling on the development of the adrenocortical stress response. *Neuroendocrinology* 45: 278-285.

Mellstrom, B., Naranjo, J.R., Santos, A., González, M. y Bernal, J. (1991) Independent expression of the alpha and beta c-erbA genes in developing rat brain. *Mol. Endocrinol.* 5: 1339-1350

- Miller, M.W. (1988) Effect of prenatal exposure to ethanol on the development of cerebral cortex: I Neuronal generation. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 12: 440-449.
- Miller, M.W. y Robertson, S. (1993) Prenatal exposure to ethanol alters the postnatal development and transformation of radial glia to astrocytes in the cortex. *J. Comp. Neurol.* 337: 253-266.
- Mirell, C.J., Yanagisawa, M., Lau, R., Pekary, E., Chin, W.W. y Hershman, J.M. (1987) Influence of thyroid status on pituitary content of thyrotropin-beta and alpha-subunit, growth hormone and prolactin messenger ribonucleic acids. *Mol. Endocrinol.* 1: 408-412.
- Miyake, T., Imamura, Y., Fukuda, M. y Kitamura, T. (1989) Delay of astrocyte reaction in the injured cerebral cortex of hypothyroid mouse. *Brain Res.* 493: 376-379.
- Morreale de Escobar, G., Perales, M.C., Obregón, M.J. y Escobar del Rey, F. (1982) Detección precoz del hipotiroidismo congénito: objetivos y actuación. *Endocrinología* 29: 24-112.
- Morreale de Escobar, G. y Escobar del Rey, F. (1983) Thyroid hormone and the developing brain. En: *Congenital hypothyroidism*, Dussault P., Walker P. (eds), Academic press, New York, 85-127.
- Morreale de Escobar, G., Pastor, R., Obregón, M.J. y Escobar del Rey, F. (1985) Effects of maternal hypothyroidism on the weight and thyroid hormone content of rat embryonic tissues. *Endocrinology* 117: 1890-1896.
- Morreale de Escobar, G., Obregón, M.J., Ruiz de Oña, C. y Escobar del Rey F. (1988) Transfer of thyroxine from the mother to the rat fetus near term: Effects on brain 3,5,5'-triiodothyronine deficiency. *Endocrinology* 122: 1521-1531.
- Morreale de Escobar, G., Obregón, M.J. y Escobar del Rey, F. (1989) Transfer of thyroid hormones from the mother to the fetus. En: *Research in Congenital hypothyroidism*, (Eds). F. Welange, D.A. Foster and D. Glinioer, Plenum Press, London and NY, pp 15-29.
- Muñoz, A., Rodríguez-Peña, A., Pérez-Castillo, A., Ferreiro, B., Gregor Sutcliffe, J. y Bernal, J. (1991) Effects of neonatal hypothyroidism on rat brain gene expression. *Mol Endocrinol.* 5: 273-280.
- Nauta, W.J.H. y Domesick, V.B. (1984) Afferent and efferent relationship of the basal ganglia. En: *Functions of the basal ganglia* (Ciba Foundation, Symposium 107). Pitman. London, p 3-29.
- Nicholson, J.L. y Altman, J. (1972) The effects of early hypo- and hyperthyroidism on the development of rat cerebellar cortex. I. Cell proliferation and differentiation. *Brain Res.* 44: 13-23.
- Noble, M. y Murray, K. (1984) Purified astrocytes promote the in vitro divisions of a bipotential glial progenitor cell. *EMBO J.* 3: 2243-2247.



- Obregón, M.J., Morreale de Escobar, G. y Escobar del Rey, F. (1978) Concentrations of triiodothyronine in the plasma and tissues of normal rats as determined by radioimmunoassay: Comparison with results obtained by an isotopic equilibration technique. *Endocrinology* 103: 2145-21.
- Obregón, M.J., Mallol, J., Morreale de Escobar, G. y Escobar del Rey, F. (1984) L-thyroxine and 3,5,3'-triiodo-L-thyroxine in rat embryos before onset of fetal function. *Endocrinology* 114: 305-307.
- Obregón, M.J., Ruiz de Oña, C., Calvo, R., Escobar del Rey, F. y Morreale de Escobar, G. (1991) Outer ring iodothyronine deiodinases and thyroid hormone economy: Response to iodine deficiency in the rat fetus and neonate. *Endocrinology* 129: 2663-2673.
- Oppenheimer, J.H. (1979) Thyroid hormone action at the cellular level. *Science* 203: 971-979.
- O'Callaghan, J.P., Brinton, R.E. y McEwen, B.S. (1991) Glucocorticoids regulate the synthesis of glial fibrillary acidic protein in intact and adrenalectomized rats but do not affect its expression following brain injury. *J. Neurochem.* 57: 860-869.
- Patel, A., Hunt, A. y Kiss, J. (1989) Neonatal thyroid deficiency has differential effects on cell specific markers for astrocytes and oligodendrocytes in the rat brain. *Neurochem. Int.* 15: 339-248.
- Paternostro, M.A. y Meisami, E. (1993) Developmental plasticity of the rat olfactory receptor as shown by complete recovery of surface area and cell number from extensive early hypothyroid growth retardation. *Dev. Brain Res.* 76: 151-161.
- Paternostro, M.A. y Meisami, E. (1994) Quantitative [3H] thymidine autoradiography of neurogenesis in the olfactory epithelium of developing normal, hypothyroid and hypothyroid rehabilitated rats. *Dev. Brain Res.* 83: 151-162.
- Perez-Castillo, A., Bernal, J., Ferreiro, B. y Pans, T. (1985) The early ontogenesis of thyroid hormone receptor in the rat fetus. *Endocrinology* 117: 2457-2461.
- Piosik, P.A., Van Groningen, M., Ponne, N.J., Bolhuis, P.A. y Baas, F. (1995) RC3/Neurogranin structure and expression in the caprine brain in relation to congenital hypothyroidism. *Mol. Brain Res.* 29: 119-30.
- Poltorak, M., Sadoul, R., Keilhauer, G., Landa, C., Fahrig, T. y Schachner, M. (1987). Myelin-associated glycoprotein, a member of the L2/HNK-1 family of neural cell adhesion molecules, is involved in neuron-oligodendrocyte and oligodendrocyte-oligodendrocyte interaction. *J. Cell Biol.* 105: 1893-1899.
- Potter, B.J., Mano, M.T., Belling, G.B., McIntosh, G.H., Hua, C., Cragg, B.J., Marshall, J., Wellby, M.L. y Hetzel, B.S. (1987) Retarded fetal brain development resulting from severe dietary iodine deficiency in sheep. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 8: 303-313.
- Potter, G.D., Tong, W. y Chaikoff, I.L. (1959) The metabolism of <sup>131</sup>I-labeled iodine, thyroxine and triiodothyronine in the mammary gland of the lactating rat. *J. Biol. Chem.* 234: 350-354.

- Rabie, A., Patel, A.J., Clavel, M.C. y Legrand, J. (1979) Effect of thyroid deficiency on the growth of the hippocampus in the rat. A combined biochemical and morphological study. *Dev. Neurosci.* 2: 183-194.
- Rakic, P. (1972) Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J. Comp. Neurol.* 145: 61-84
- Rakic, P. (1981) Developmental events leading to laminar and areal organization of the neocortex. In: Schmitt FO, Dennis SG, Worden FG (eds). *The cerebral cortex*. MIT Press, Cambridge, pp 7-28.
- Rakic, P., Verne, S. y Caviness, V.S. jr. (1995). Cortical development: View from neurological mutants two decades later. *Neuron* 14: 1101-1104.
- Ramie, A., Rabie, A. y Patel, A. (1986) Thyroid hormone and development of the rat hippocampus: cell acquisition in the dentate gyrus. *Neuroscience* 19: 1217-1226.
- Ramie, A. y Rabie, A. (1988). Effect of thyroid deficiency on the development of glia in the hippocampal formation of the rat: an immunocytochemical study. *Glia* 1: 337-345.
- Ramie, A y Rabie, A. (1990) Delayed synaptogenesis in the dentate gyrus of the thyroid-deficient developing rat. *Dev. Neurosci.* 12: 398-405
- Reynolds, R. y Wilkin, G.P. (1988) Development of macroglial cells in rat cerebellum II. An in situ immunohistochemical study of oligodendroglial lineage from precursor to mature myelinating cell. *Development* 102: 409-425.
- Rickmann, M., Amaral, D.G. y Cowan, M. (1987) Organization of radial glial cells during the development of the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 264: 449-479.
- Riesco, G., Taurog, A., Larsen, P.R. y Krulich, L. (1977) Acute and chronic responses to iodine deficiency in a primate model (Callythrix Jacchus Jacchus). *J. Neurol. Sci.* 79: 287-300.
- Rodriguez-Peña, A., Ibarrola, N., Iñiguez, M.A., Muñoz, A. y Bernal, J. (1993) Neonatal hypothyroidism affects the timely expression of myelin-associated glycoprotein in the rat brain. *J. Clin. Invest.* 91: 812-818.
- Rosenbluth, J. (1980) Central myelin in the mouse mutant shiverer. *J.Comp. Neurol.* 194: 639-648.
- Ruiz-Marcos, A., Sanchez-Toscano, F., Escobar del Rey, F. y Morreale de Escobar, G. (1979) Severe hypothyroidism and the maturation of the rat cerebral cortex. *Brain Res.* 162: 315-329.
- Ruiz-Marcos, A., Sanchez-Toscano, F., Escobar del Rey, F. y Morreale de Escobar, G. (1980) Reversible morphological alterations of cortical neurons in juvenile and adult hypothyroidism in the rat. *Brain Res.* 185: 91-102.

Ruiz-Marcos, A., Sanchez-Toscano, F., Obregón, M.J., Escobar del Rey, F. y Morreale de Escobar, G. (1982) Thyroxine treatment and recovery of hypothyroidism-induced pyramidal cell damage. *Brain Res.* 239: 559-574.

Ruiz-Marcos, A. e Ipiña, S.L. (1986) Hypothyroidism affects preferentially the dendritic densities on the more superficial region of pyramidal neurons of the rat cerebral cortex. *Dev. Brain Res.* 28: 259-262.

Ruiz-Marcos, A. (1988) Quantitative study of the effects of hypothyroidism on the development of the cerebral cortex. In R.DeLong and J. Robbins (Eds.). *The Role of Iodine in Neurodevelopment*. Vol. 1: 91-102.

Ruiz-Marcos, A., Cartagena Abella, P., Martínez-Galán, J.R., Calvo, R., Morreale de Escobar, G. y Escobar del Rey, F. (1994) Thyroxine treatment and the recovery of pyramidal cells of the cerebral cortex from changes induced by juvenile-onset hypothyroidism. *J. Neurobiol.* 25: 808-818.

Samuels, H.H., Forman, B.M., Horowitz, Z.D. y Ye, Z.S. (1988) Regulation of gene expression by thyroid hormone. *J. Clin. Invest.* 81: 957-967.

Santiesteban, P., Obregón, M.J., Rodríguez-Peña, A. Lamas, L., Escobar del Rey, F., Morreale de Escobar, G. (1982) Are iodine-deficient rats euthyroid?, *Endocrinology* 110: 1780-1789.

Schwartz, H.L. y Oppenheimer, J.H. (1978) Nuclear triiodothyronine receptor sites in brain: probable identity with hepatic receptors and regional distribution: *Endocrinology* 103: 267-273.

Seo, H., Refetoff, S., Martino, E., Vassart, G. y Brocas, H. (1979). The differential stimulatory effect of thyroid hormone on growth hormone synthesis and estrogen and prolactin synthesis due to accumulation of specific messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 104: 1083-1090.

Silver, J.M., Edwards, M.A. y Levitt (1993) Immunocytochemical demonstration of early appearing astroglial structures that form boundaries and pathways along axon tracts in the fetal brain. *J. Comp. Neurol.* 156: 415-416

Stichel, C.C., Müller, C.M. y Zilles, K. (1991) Distribution of glial fibrillary acidic protein and vimentin immunoreactivity during rat visual cortex development. *J. Neurocytol.* 20: 97-108.

Strait, K.A., Schwartz, H.L., Seybold, V.S., Ling, N.C. y Oppenheimer, J.H. (1991) Immunofluorescence localization of thyroid hormone receptor protein beta-1 and variant alpha-2 in selected tissues: Cerebellar Purkinje cells as a model for beta-1 receptor-mediated developmental effects of thyroid hormone in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3887-3891.

Sugisaki, T., Noguchi, T., Beamer, W.G. y Kozak, L.P. (1991) Genetic hypothyroid mice: normal cerebellar morphology but altered glycerol-3-phosphate dehydrogenase in Bergmann glia. *J. Neurosci.* 11: 2614-21.

Sugisaki, T., y Noguchi, T. (1992) Stimulatory effects of exogenous thyroid hormone and growth hormone on sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity in the genetic hypothyroid mutant mice cerebellum: restricted to the second 20 days of postnatal life. *J. Neurochem.* 59: 2005-11.

- Thompson, C.C., Weinberger, C., Lebo, R. y Evans, R.M. (1987) Identification of a novel thyroid hormone receptor expressed in the mammalian central nervous system. *Science* 237: 1610-1614.
- Tosic, M., Torch, S., Comte, V., Dolivo, M., Honneger, P. y Matthieu, J.M. (1992) Triiodothyronine has diverse and multiple stimulating effects on expression of the major myelin protein genes. *J. Neurochem.* 59: 1770-77.
- Van Middlesworth, L.(1977) Audiogenic seizures in rats after severe prenatal and perinatal iodine depletion, *Endocrinology* 100: 242
- Van Middlesworth, L. y Norris, C.H. (1980) Audiogenic seizures and cochlear damage in rats after perinatal antithyroid treatment. *Endocrinology* 106: 1686.
- Walravens, P. y Chase, H.P. (1969) Influence of thyroid hormone on formation of myelin lipids. *J. Neurochem.* 16: 1477-1484.
- Watson, J., Gregor Sutcliffe, J. y Fisher, R. (1992) Localization of the protein kinase C phosphorylation/calmodulin-binding substrate RC3 in dendritic spines of neostriatal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 8581-8585
- Weibel, E. R. (1979) *Stereological Methods*. vol 1, p 109 London: Academic Press
- Weinbergen. C., Thompson, C.C., Ong, E.S., Lebo, R., Grujold, D.J. y Evans, R.M. (1986) The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature* 324: 641-646
- Weiss, R.M., y Noback, C.R. (1949) The effects of thyroxine and thiouracil on the time of appearance of ossification centers of rat fetuses. *Endocrinology* 45: 389
- Woods, R.J., Sinha, A.K. y Ekins, R. (1984) Uptake and metabolism of thyroid hormones by the rat foetus in early pregnancy. *Clin. Sci.* 67:359
- Xuan, S., Baptista, C.A., Balas, G., Tao, W., Soares V.C. y Lai, E. (1995) Winged helix transcription factor BF-1 is essential for the development of the cerebral hemispheres. *Neuron* 14: 1141-1152.
- Zhang, X., Wills, K.N., Husmann, M., Hermann, M., Hermann, T. y Pfahl, M. (1991) Novel pathway for thyroid hormone receptor action through interaction with jun and for oncogene activities. *Mol. Cell. Biol.* 11: 6016-10.